

DESCRIPTION

PREVENTIVE OR REMEDY FOR INFLAMMATORY DISEASE

5 Technical Field

The present invention relates to novel agents for preventing or treating inflammatory diseases, which comprise NR 10 antagonists as active ingredients. The present invention also relates to methods for preventing or treating inflammatory diseases, which use NR 10 antagonists.

10

Background Art

Many cytokines are known as humoral factors involved in the growth and differentiation of various types of cells, or in the activation of differentiated mature cell functions.

Cytokine-stimulated cells produce different types of cytokines, thereby forming networks of multiple cytokines in the body. Biological homeostasis is maintained by a delicate balance of the mutual regulation between cytokines in these networks. Many inflammatory diseases are thought to result from a failure of such cytokine networks. Thus, monoclonal antibody-based anti-cytokine therapy is drawing much attention. For example, anti-TNF antibodies and anti-IL-6 receptor antibodies have been demonstrated to be highly effective clinically. On the other hand, there are many examples of failure where no therapeutic effects were produced when a single cytokine, such as IL-4, was blocked alone, due to the activation of compensatory pathways in actual pathological conditions.

The present inventors succeeded in isolating a novel cytokine receptor NR 10 that was highly homologous to gp130, a receptor for IL-6 signal transduction (Patent Document 1). NR 10 forms a heterodimer with oncostatin M receptor (OSMR) and functions as an IL-31 receptor (Non-patent Document 1). Zymogenetics, Inc. reported that transgenic mice overexpressing IL-31 spontaneously developed pruritic dermatitis (Patent Document 2).

However, it cannot be asserted that the forced expression of a cytokine in mice or a high blood level of a cytokine in pathological model mice is indeed the cause of a disease. There is no information on whether any therapeutic effects are produced when a signal is blocked by an antibody. For example, pruritic dermatitis develops in transgenic mice in which IL-18 is overexpressed in keratinocytes. Furthermore, the blood IL-18 concentration elevates with the progression of pathological conditions in NC/Nga model mice for spontaneous atopic dermatitis. Based on the above findings, the overexpression of IL-18 was predicted to be the cause of disease. In reality however, the administration of neutralizing antibodies produced no therapeutic effects (Non-patent Document 2).

As described above, inhibition of the function of a cytokine does not necessarily produce therapeutic effects in diseases in which the expression level of a cytokine is elevated. Prediction of diseases on which therapeutic effects are actually produced is difficult to make based on the expression level of a cytokine. It is thus important to find diseases in which inhibition of signal transduction of a target cytokine actually produces therapeutic effects.

Prior art documents of the present invention are described below.

Patent Document 1: WO 00/75314

Patent Document 2: WO 03/060090

Non-patent Document 1: IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis, J Allergy Clin Immunol. 2006 Feb; 117(2): 418-25

Non-patent Document 2: Administration of anti-interleukin 18 antibody fails to inhibit development of dermatitis in atopic dermatitis-model mice NC/Nga, British Journal of Dermatology 149: 39-45, 2003

Disclosure of the Invention

[Problems to be Solved by the Invention]

The present invention was achieved in view of the circumstances described above. An objective of the present invention is to provide cytokine receptor antagonist-based anti-cytokine therapies for inflammatory diseases. More specifically, the objective of the present invention is to discover inflammatory diseases in which a therapeutic effect may be obtained by anti-NR 10 neutralizing antibodies, and to provide novel methods for treating such diseases. Another objective of the present invention is to provide anti-human NR 10 neutralizing antibodies that are clinically applicable to humans.

[Means for Solving the Problems]

The present inventors conducted dedicated studies to solve the above-described objectives. The present inventors tried to assess the drug efficacy of anti-mouse NR 10 neutralizing antibodies in mouse models for various pathological conditions. The results demonstrated that the neutralizing antibodies produced the effect of markedly suppressing symptoms in atopic dermatitis model mice using NC/Nga mice, and in model mice for chronic dermatitis, which were developed by repeated application of picryl chloride. This proved that the neutralizing antibodies were actually useful as a therapeutic agent. In addition, the antibodies were demonstrated to produce the effect of suppressing symptoms in collagen arthritis, a model for rheumatism, and in collagenase arthritis, a model for osteoarthritis. These results suggest that the NR 10-neutralizing antibody of the present invention can be used to prevent or

treat chronic inflammation. The present inventors also succeeded in obtaining human NR 10 neutralizing antibodies. Specifically, the present invention provides:

[1] an agent for preventing or treating an inflammatory disease, wherein the agent comprises an NR 10 antagonist as an active ingredient;

5 [2] the preventive or therapeutic agent of [1], wherein the NR 10 antagonist is an antibody having an NR 10 neutralizing activity;

[3] the preventive or therapeutic agent of [2], wherein the antibody is a monoclonal antibody;

[4] the preventive or therapeutic agent of [2], wherein the antibody is a monoclonal antibody having a human NR 10 neutralizing activity;

10 [5] the preventive or therapeutic agent of any one of [2] to [4], wherein the antibody is a recombinant antibody;

[6] the preventive or therapeutic agent of [5], wherein the recombinant antibody is a chimeric antibody, humanized antibody, or human antibody;

15 [7] the preventive or therapeutic agent of any one of [2] to [6], wherein the agent comprises as an active ingredient a fragment and/or a modified fragment of the antibody with NR 10 neutralizing activity;

[8] the preventive or therapeutic agent of any one of [1] to [7], wherein the inflammatory disease is atopic dermatitis;

20 [9] the preventive or therapeutic agent of any one of [1] to [7], wherein the inflammatory disease is chronic dermatitis;

[10] the preventive or therapeutic agent of any one of [1] to [7], wherein the inflammatory disease is rheumatism;

[11] the preventive or therapeutic agent of any one of [1] to [7], wherein the inflammatory disease is osteoarthritis;

25 [12] an antibody having an NR 10 neutralizing activity;

[13] the antibody of [12], which is a monoclonal antibody;

[14] the antibody of [12], wherein NR 10 is human NR 10;

[15] the antibody of any one of [12] to [14], which is a recombinant antibody;

30 [16] the antibody of [15], wherein the recombinant antibody is a chimeric antibody, humanized antibody, or human antibody;

[17] a fragment and/or a modified fragment of the antibody of any one of [12] to [16]

[18] a method for preventing or treating an inflammatory disease, which comprises the step of administering an NR 10 antagonist to a patient with an inflammatory disease; and

35 [19] use of an NR 10 antagonist to produce an agent for preventing or treating an inflammatory disease.

Brief Description of the Drawings

Fig. 1 is a graph showing a result obtained by observing the cell growth-suppressing effect of BM095 added to a cell growth assay system using IL-31-dependent Ba/F3 cells. The horizontal axis indicates estimated mIL-31 concentrations in the assay system, and the vertical axis indicates cell counts (OD450 (absorbance at 450 nm)). Amounts of BM095 added (unit: ng/ml) are shown in the legend. A cell-growth suppressing effect dependent on the amount of BM095 added was observed.

Fig. 2 is a graph showing a therapeutic effect produced when anti-NR 10 antibodies were administered to atopic dermatitis model mice. A significant inflammation-suppressing effect was seen in the anti-NR 10 antibody administered group as compared with the negative control group (vehicle group).

Fig. 3 is a graph showing a sequential change in body weight after anti-NR 10 antibodies were administered to atopic dermatitis model mice. Weight loss was observed in the group administered with an existing anti-inflammatory agent. In contrast, no weight change was detected in the anti-NR 10 antibody-administered group. Thus, the anti-NR 10 antibody was proven to be safe.

Fig. 4 is a graph showing a therapeutic effect produced when anti-NR 10 antibodies were administered to chronic dermatitis model mice. A significant auricle swelling-suppressing effect was found in the anti-NR 10 antibody-administered group.

Fig. 5 is a photograph showing immunohistochemical staining of the auricle of a chronic dermatitis model mouse. As with the case of humans, the expression of mouse NR 10 was found to be enhanced in thickened epidermis.

Fig. 6 is a graph showing an arthritis-suppressing effect produced when anti-NR 10 antibodies were administered to collagen-induced arthritis model mice.

Fig. 7 is a graph showing the relationship between the area under the curve (AUC) and the concentration of BM095 administered to the collagenase-induced arthritis (osteoarthritis) model. AUC means the area under the curve of transition of the difference between the right and left knee joint widths defined as a value representing swelling in the right knee joint.

Fig. 8 is a graph showing the correlation between the concentration of human NR 10 neutralizing antibodies (purified antibody) and cell growth-suppressing activity in the presence of IL-31. Antibodies 1, 2, and 3 exhibited strong NR 10-neutralizing activity.

Fig. 9 is a graph showing the correlation between the concentration of chimeric antibody NA633 against human NR 10 and cell growth-suppressing activity in the presence of IL-31. NA633 exhibited strong NR 10-neutralizing activity.

Fig. 10 is a diagram comparing the amino acid sequences of human NR 10 and NR 10 of a cynomolgus monkey. The double-underlined sequence indicates the transmembrane

region.

Fig. 11 is a graph showing the cell growth-suppressing activity of the chimeric antibody NA633 in human-IL-31 stimulated cynomolgus monkey NR 10/human OSMR/BaF cell line.

NA633 also showed cynomolgus monkey NR 10-neutralizing activity.

Fig. 12 is a graph showing the transition of percent body weight change in DSS colitis model mice.

Fig. 13 is a graph showing the transition of change in the thickness of the auricle in the acute contact dermatitis model using picryl chloride.

Best Mode for Carrying Out the Invention

The present invention relates to agents for preventing or treating inflammatory diseases, which comprise NR 10 antagonists as active ingredients. The present invention is based on the present inventors' finding that NR 10 antagonists (for example, anti-NR 10 neutralizing antibodies) significantly suppress symptoms in model mice with atopic dermatitis, chronic dermatitis, rheumatism, osteoarthritis or such.

NR 10 is a protein that forms a heterodimer with oncostatin M receptor (OSMR), and functions as an IL-31 receptor. NR 10 is also known by other names, such as glm-r (J Biol Chem 277, 16831-6, 2002), GPL (J Biol Chem 278, 49850-9, 2003), and IL-31RA (Nat Immunol 5, 752-60, 2004). The NR 10 of the present invention includes proteins called by such names. The NR 10 of the present invention also includes NR 10 derived from humans, mice, and other mammals. Preferred NR 10 includes human- and mouse-derived NR 10, but is not limited thereto. There are multiple known splicing variants of human-derived NR 10 (WO 00/075314). Of the above-described splicing variants, NR 10.1 consists of 662 amino acids and comprises a transmembrane domain. NR 10.2 is a soluble receptor-like protein consisting of 252 amino acids without the transmembrane domain. Meanwhile, known NR 10 splicing variants that function as transmembrane receptor proteins include NR 10.3 and IL-31RAv3. The human NR 10 of the present invention is not particularly limited, as long as it forms a heterodimer with oncostatin M receptor (OSMR) and functions as an IL-31 receptor. Preferred NR 10 includes NR 10.3 (also referred to as ILRAv4 (Nat Immunol 5, 752-60, 2004)) and IL-31RAv3. NR 10.3 (IL-31RAv4) consists of 662 amino acids (WO 00/075314; Nat Immunol 5, 752-60, 2004) and IL-31RAv3 consists of 732 amino acids (GenBank Accession No: NM_139017). The amino acid sequence of IL-31RAv4 is shown in SEQ ID NO: 6, and the amino acid sequence of IL-31RAv3 is shown in SEQ ID NO: 7. Meanwhile, mouse-derived NR 10 includes proteins comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5.

The NR 10 antagonists of the present invention refer to substances that bind to NR 10 and block NR 10-activation-based intracellular signal transduction, thereby causing loss or

suppression of physiological activities of cells. Herein, physiological activities include, for example, activities of inducing or suppressing the production of physiologically active substances (for example, chemokines and inflammatory cytokines), activities of enhancing or suppressing the secretion of the substances, growth activity, growth-inducing activity, survival activity, differentiation activity, differentiation-inducing activity, transcriptional activity, membrane transport activity, binding activity, proteolytic activity, phosphorylation/dephosphorylation activity, oxidation-reduction activity, transfer activity, nucleolytic activity, dehydration activity, cell-death-inducing activity, and apoptosis-inducing activity, but are not limited thereto.

The presence of antagonist activity can be determined by methods known to those skilled in the art. For example, test compounds are contacted with NR 10 expressed on the surface of cells in the presence of a ligand, and it is determined whether or not intracellular signal transduction, which is an indicator of NR 10 activation, is generated. Such a determination can be made, for example, by the method described in the document “Dillon SR, *et al.*, Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol.* 2004 Jul; 5(7):752-60”. Compounds that inhibit intracellular signal transduction in response to ligand stimulation are thought to serve as NR 10 antagonists.

The antagonists of the present invention may be natural or artificial compounds. Known compounds may be used as the antagonists of the present invention. Novel compounds determined to have antagonist activity by the methods described above may also be used.

In an embodiment of the present invention, the NR 10 antagonists include antibodies having the activity of neutralizing NR 10. The “antibodies having NR 10-neutralizing activity” of the present invention refer to antibodies having the activity of suppressing NR 10-based physiological activities. The “antibodies having NR 10-neutralizing activity” of the present invention may be polyclonal or monoclonal antibodies, and as a preferred embodiment, includes monoclonal antibodies.

Such monoclonal antibodies having NR 10-neutralizing activity, can be obtained, for example, by the following procedure: anti-NR 10 monoclonal antibodies are prepared by using as an antigen NR 10 or a fragment thereof that is derived from a mammal, such as human or mouse, by known methods, and then antibodies having NR 10-neutralizing activity are selected from the thus obtained anti-NR 10 monoclonal antibodies. Specifically, immunization is achieved by conventional immunization methods using as a sensitizing antigen a desired antigen or cells expressing the desired antigen. Anti-NR 10 monoclonal antibodies can be prepared by fusing the obtained immune cells with known parental cells using conventional cell fusion methods, and screening them for monoclonal antibody-producing cells (hybridomas) by conventional screening methods. Animals to be immunized include, for example, mammals,

such as mice, rats, rabbits, sheep, monkeys, goats, donkeys, cows, horses, and pigs. The antigen can be prepared using the known NR 10 gene sequence according to known methods, for example, by methods using baculovirus (for example, WO 98/46777). As described in Examples herein below, antibodies having NR 10-neutralizing activity may be selected, for example, by testing the effect of suppressing the growth of an IL-31-dependent cell line after the candidate antibody is added to cells of the IL-31-dependent cell line. Antibodies that suppress the growth of IL-31-dependent cell line in the method described above are considered to have NR 10-neutralizing activity.

Hybridomas can be prepared, for example, according to the method of Milstein *et al.* (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46) or such. When the immunogenicity of an antigen is low, immunization may be performed after linking the antigen with a macromolecule having immunogenicity, such as albumin.

In a preferred embodiment of the present invention, antibodies having NR 10-neutralizing activity include monoclonal antibodies having the activity of neutralizing human NR 10. There is no particular limitation on the immunogen for preparing monoclonal antibodies having the activity of neutralizing human NR 10, as long as it allows preparation of antibodies having the activity of neutralizing human NR 10. For example, multiple variants of human NR 10 are known to exist. Any of the variants may be used as immunogens, as long as it allows preparation of antibodies having human NR 10 neutralizing activity. Alternatively, a peptide fragment of NR 10 or a natural NR 10 sequence introduced with artificial mutations may be used as the immunogen under the same conditions. Human NR 10.3 is a preferred immunogen to prepare antibodies of the present invention that have NR 10-neutralizing activity.

Herein, the above-described antibodies of the present invention are not particularly limited, as long as they have NR 10-neutralizing activity. The antibodies also include recombinant antibodies such as chimeric antibodies, humanized antibodies, and human antibodies. The chimeric antibodies comprise, for example, the heavy and light chain constant regions of a human antibody, and the heavy and light chain variable regions of a non-human mammal, such as mouse. The chimeric antibodies can be produced by known methods. For example, the antibodies can be produced by cloning an antibody gene from hybridomas, inserting it into an appropriate vector, and introducing the construct into hosts (see, for example, Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Specifically, cDNAs of the antibody variable regions (V regions) are synthesized from mRNA of hybridomas using reverse transcriptase. Once DNAs encoding the V regions of an antibody of interest are obtained, these are linked with DNAs encoding the constant regions (C regions) of a desired human antibody. The resulting constructs are inserted into expression vectors. Alternatively,

the DNAs encoding the antibody V regions may be inserted into expression vectors comprising DNAs encoding the C regions of a human antibody. The DNAs are inserted into expression vectors so that they are expressed under the regulation of the expression regulatory regions, for example, enhancers and promoters. In the next step, host cells can be transformed with the expression vectors to allow expression of chimeric antibodies.

A humanized antibody, which is also called a reshaped human antibody, is obtained by transferring a complementarity determining region (CDR) of an antibody of a nonhuman mammal such as a mouse, with the CDR of a human antibody. Conventional genetic recombination techniques for the preparation of such antibodies are also known. Specifically, a DNA sequence designed to ligate a CDR of a mouse antibody with the framework regions (FRs) of a human antibody is synthesized by PCR, using several oligonucleotides constructed to comprise overlapping portions at their ends. A humanized antibody can be obtained by (1) ligating the resulting DNA to a DNA that encodes a human antibody constant region; (2) incorporating this into an expression vector; and (3) transfecting the vector into a host to produce the antibody (see European Patent Application No. EP 239,400 and International Patent Application Publication No. WO 96/02576). Human antibody FRs that are ligated *via* the CDR are selected where the CDR forms a favorable antigen-binding site. As necessary, amino acids in the framework region of an antibody variable region may be substituted such that the CDR of a reshaped human antibody forms an appropriate antigen-binding site (Sato, K. *et al.*, Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

Methods for obtaining human antibodies are also known. For example, desired human antibodies with antigen-binding activity can be obtained by (1) sensitizing human lymphocytes with antigens of interest or cells expressing antigens of interest *in vitro*; and (2) fusing the sensitized lymphocytes with human myeloma cells such as U266 (see Japanese Patent Application Kokoku Publication No. (JP-B) H01-59878 (examined, approved Japanese patent application published for opposition)). Alternatively, the desired human antibody can also be obtained by using a desired antigen to immunize a transgenic animal that comprises an entire repertoire of human antibody genes (see International Patent Application Publication Nos. WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, and WO 96/33735).

Furthermore, techniques to obtain human antibodies by panning with a human antibody phage library are known. For example, the variable region of a human antibody is expressed as a single chain antibody (scFv) on the surface of a phage, using a phage display method, and phages that bind to the antigen can be selected. By analyzing the genes of selected phages, the DNA sequences encoding the variable regions of human antibodies that bind to the antigen can be determined. If the DNA sequences of scFvs that bind to the antigen are identified, appropriate expression vectors comprising these sequences can be constructed to obtain human

antibodies. Such methods are well known (see WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, and WO 95/15388).

The amino acid sequence of the heavy chain variable region or light chain variable region may be an amino acid sequence with a substitution, deletion, addition, and/or insertion of one or more amino acids in the amino acid sequence of the heavy chain variable region or light chain variable region of an antibody that has been confirmed to have NR 10-neutralizing activity, as long as NR 10-neutralizing activity is retained. Methods well known to those skilled in the art to prepare the amino acid sequence of the heavy chain variable region or light chain variable region of the antibody having NR 10-neutralizing activity, which comprises a substitution, deletion, addition, and/or insertion of one or more amino acids in the amino acid sequence of the heavy chain variable region or light chain variable region, include known methods for introducing mutations into proteins. For example, those skilled in the art can prepare mutants functionally equivalent to the heavy chain variable region or light chain variable region of the antibody having NR 10-neutralizing activity by introducing appropriate mutations into the amino acid sequence of the heavy chain variable region or light chain variable region of the antibody having NR 10-neutralizing activity using site-directed mutagenesis (Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. *Gene* 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol.* 100, 468-500, Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M, and Fritz, HJ (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456, Kramer W, and Fritz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA *Methods. Enzymol.* 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82, 488-492) or the like. Thus, heavy chain variable regions or light chain variable regions that comprise mutations at one or more amino acids in the heavy chain variable region or light chain variable region of the antibody having NR 10-neutralizing activity are also included in the heavy chain variable region or light chain variable region of the present invention.

When an amino acid residue is altered, the amino acid is preferably mutated for a different amino acid(s) that conserves the properties of the amino acid side-chain. Examples of amino acid side chain properties are: hydrophobic amino acids (A, I, L, M, F, P, W, Y, and V), hydrophilic amino acids (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, and T), amino acids comprising aliphatic side chains (G, A, V, L, I, and P), amino acids comprising hydroxyl group-containing side chains (S, T, and Y), amino acids comprising sulfur-containing side chains (C and M), amino acids comprising carboxylic acid- and amide-containing side chains (D, N, E, and Q), amino acids

comprising basic side chains (R, K, and H), and amino acids comprising aromatic side chains (H, F, Y, and W) (amino acids are represented by one-letter codes in parentheses). Amino acid substitutions within each group are called conservative substitutions. It is already known that a polypeptide comprising a modified amino acid sequence in which one or more amino acid residues in a given amino acid sequence are deleted, added, and/or substituted with other amino acids can retain the original biological activity (Mark, D. F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA; (1984) 81:5662-6; Zoller, M. J. and Smith, M., Nucleic Acids Res. (1982) 10:6487-500; Wang, A. *et al.*, Science (1984) 224:1431-3; Dalbadie-McFarland, G. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79:6409-13). Such mutants comprise an amino acid sequence which is at least 70% identical to the amino acid sequence of a heavy chain variable region or light chain variable region of the present invention, more preferably at least 75%, even more preferably at least 80%, still more preferably at least 85%, yet more preferably at least 90%, and most preferably at least 95% identical. Herein, sequence identity is defined as the percentage of residues identical to those in the original amino acid sequence of the heavy chain variable region or light chain variable region, determined after the sequences are aligned and gaps are appropriately introduced to maximize the sequence identity as necessary. The identity of amino acid sequences can be determined by the method described above.

Alternatively, an amino acid sequence of the heavy chain variable region or light chain variable region that comprises a substitution, deletion, addition, and/or insertion of one or more amino acids in the amino acid sequence of the heavy chain variable region or light chain variable region and retains NR 10-neutralizing activity can be obtained from nucleic acid that hybridizes under stringent conditions to nucleic acid comprising the nucleotide sequence encoding the amino acid sequence of the heavy chain variable region or light chain variable region. Stringent hybridization conditions to isolate a nucleic acid that hybridizes under stringent conditions to a nucleic acid that comprises the nucleotide sequence encoding the amino acid sequence of the heavy chain variable region or light chain variable region include, for example, the conditions of 6M urea, 0.4% SDS, 0.5x SSC, and 37°C, or hybridization conditions with stringencies equivalent thereto. With more stringent conditions, for example, the conditions of 6M urea, 0.4% SDS, 0.1x SSC, and 42°C, isolation of nucleic acids with a much higher homology can be expected. The sequences of the isolated nucleic acids can be determined by the known methods described below. The overall nucleotide sequence homology of the isolated nucleic acid is at least 50% or higher sequence identity, preferably 70% or higher, more preferably 90% or higher (for example, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or higher).

A nucleic acid that hybridizes under stringent conditions to a nucleic acid comprising the nucleotide sequence encoding the amino acid sequence of the heavy chain variable region or light chain variable region can also be isolated using, instead of the above-described methods

using hybridization techniques, gene amplification methods using primers synthesized based on the information of nucleotide sequence encoding the amino acid sequence of the heavy chain variable region or light chain variable region, for example, polymerase chain reaction (PCR).

Specifically, the identity of one nucleotide sequence or amino acid sequence to another can be determined using the algorithm BLAST, by Karlin and Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 5873-7). Programs such as BLASTN and BLASTX were developed based on this algorithm (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. (1990) 215, 403-10). To analyze nucleotide sequences according to BLASTN based on BLAST, the parameters are set, for example, as score= 100 and wordlength= 12. On the other hand, parameters used for the analysis of amino acid sequences by BLASTX based on BLAST include, for example, score= 50 and wordlength= 3. Default parameters for each program are used when using the BLAST and Gapped BLAST programs. Specific techniques for such analyses are known in the art (see the website of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), Basic Local Alignment Search Tool (BLAST); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Alternatively, the antibodies of the present invention may be minibodies. Such minibodies of the present invention include antibody fragments lacking some portions of a whole antibody (for example, whole IgG), and are not particularly limited as long as they retain NR 10-neutralizing activity. The minibodies of the present invention are not particularly limited, as long as they are portions of whole antibodies. The minibodies preferably comprise a heavy chain variable region (VH) or light chain variable region (VL). Particularly preferred minibodies comprise both VH and VL.

The minibodies of the present invention preferably have a smaller molecular weight than whole antibodies. However, the minibodies may form multimers, for example, dimers, trimers, or tetramers, and thus their molecular weights can be greater than those of whole antibodies.

The minibodies of the present invention include, for example, scFv antibodies. ScFv antibodies are single-chain polypeptides constructed by linking a heavy chain variable region ([VH]) and a light chain variable region ([VL]) *via* a linker or such (Huston, J. S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883; Plickthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113, eds., Resenbourg and Moore, Springer Verlag, New York, pp. 269-315, (1994)). The order of the heavy chain variable region and light chain variable region to be linked together is not particularly limited, and they may be arranged in any order. Examples of the arrangements are listed below.

[VH] linker [VL]

[VL] linker [VH]

The amino acid sequence of the heavy chain variable region or light chain variable

region may comprise a substitution, deletion, addition, and/or insertion. Furthermore, the heavy chain variable region and light chain variable region may also lack some portions or be added with other polypeptides, as long as they have antigen binding ability when linked together. Alternatively, the variable regions may be chimerized or humanized.

5 In the present invention, linkers which bind the variable region of the antibody comprise arbitrary peptide linkers that can be introduced using genetic engineering, or synthetic linkers (for example, linkers disclosed in "Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996").

The preferred linkers in the present invention are peptide linkers. The lengths of the peptide linkers are not particularly limited and those skilled in the art can appropriately select the
10 lengths depending on the purpose. Typical lengths are one to 100 amino acids, preferably 3 to 50 amino acids, more preferably 5 to 30 amino acids, and particularly preferably 12 to 18 amino acids (for example, 15 amino acids).

Amino acid sequences of such peptide linkers include, for example:

Ser
15 Gly•Ser
Gly•Gly•Ser
Ser•Gly•Gly
Gly•Gly•Gly•Ser (SEQ ID NO: 8)
Ser•Gly•Gly•Gly (SEQ ID NO: 9)
20 Gly•Gly•Gly•Gly•Ser (SEQ ID NO: 10)
Ser•Gly•Gly•Gly•Gly (SEQ ID NO: 11)
Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Ser (SEQ ID NO: 12)
Ser•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly (SEQ ID NO: 13)
Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Ser (SEQ ID NO: 14)
25 Ser•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly (SEQ ID NO: 15)
(Gly•Gly•Gly•Gly•Ser (SEQ ID NO: 10))_n
(Ser•Gly•Gly•Gly•Gly (SEQ ID NO: 11))_n

where n is an integer of 1 or larger.

Synthetic linkers (chemical crosslinking agents) include crosslinking agents that are
30 routinely used to crosslink peptides, for example, N-hydroxy succinimide (NHS), disuccinimidyl suberate (DSS), bis(succinimidyl) suberate (BS³), dithiobis(succinimidyl propionate) (DSP), dithiobis(succinimidyl propionate) (DTSSP), ethylene glycol bis(succinimidyl succinate) (EGS), ethylene glycol bis(sulfosuccinimidyl succinate) (sulfo-EGS), disuccinimidyl tartrate (DST), disulfosuccinimidyl tartrate (sulfo-DST), bis[2-(succinimidoxycarbonyloxy)ethyl] sulfone
35 (BSOCOES), and bis[2-(succinimidoxycarbonyloxy)ethyl] sulfone (sulfo-BSOCOES). These crosslinking agents are commercially available.

Antibodies of the present invention include antibodies in which two or more amino acid residues have been added to the amino acid sequence of an antibody of the present invention. Further, fusion proteins which result from a fusion between one of the above antibodies and a second peptide or protein is included in the present invention. The fusion proteins can be prepared by ligating a polynucleotide encoding an antibody of the present invention and a polynucleotide encoding a second peptide or polypeptide in frame, inserting this into an expression vector, and expressing the fusion construct in a host. Some techniques known to those skilled in the art are available for this purpose. The partner peptide or polypeptide to be fused with an antibody of the present invention may be a known peptide, for example, FLAG (Hopp, T. P. *et al.*, BioTechnology 6, 1204-1210 (1988)), 6x His consisting of six His (histidine) residues, 10x His, influenza hemagglutinin (HA), human c-myc fragment, VSV-GP fragment, p18HIV fragment, T7-tag, HSV-tag, E-tag, SV40 T antigen fragment, Ick tag, α -tubulin fragment, B-tag, Protein C fragment. Other partner polypeptides to be fused with the antibodies of the present invention include, for example, GST (glutathione-S-transferase), HA (influenza hemagglutinin), immunoglobulin constant region, β -galactosidase, and MBP (maltose-binding protein). A polynucleotide encoding one of these commercially available peptides or polypeptides can be fused with a polynucleotide encoding an antibody of the present invention. The fusion polypeptide can be prepared by expressing the fusion construct.

The antibodies of the present invention may differ in amino acid sequence, molecular weight, isoelectric point, presence/absence of sugar chains, and conformation depending on the cell or host producing the antibody, or purification method. However, a resulting antibody is included in the present invention, as long as it is functionally equivalent to an antibody of the present invention. For example, when an antibody of the present invention is expressed in prokaryotic cells, for example *E. coli*, a methionine residue is added to the N terminus of the original antibody amino acid sequence. Such antibodies are included in the present invention.

The antibody of the present invention can be prepared by methods known to those skilled in the art. The antibody can be prepared, for example, by genetic recombination techniques known to those skilled in the art based on the sequence of an antibody that recognizes NR 10. Specifically, such antibody can be prepared by constructing a polynucleotide encoding an antibody based on the sequence of an antibody that recognizes NR 10, inserting the construct into an expression vector, and then expressing it in appropriate host cells (see for example, Co, M. S. *et al.*, J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. *et al.*, Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137).

The vectors include M13 vectors, pUC vectors, pBR322, pBluescript, and pCR-Script. Alternatively, when aiming to subclone and excise cDNA, the vectors include, for example, pGEM-T, pDIRECT, and pT7, in addition to the vectors described above. Expression vectors are particularly useful when using vectors for producing the antibodies of the present invention.

5 For example, when aiming for expression in *E. coli* such as JM109, DH5 α , HB101, and XL1-Blue, the expression vectors not only have the above-described characteristics that allow vector amplification in *E. coli*, but must also carry a promoter that allows efficient expression in *E. coli*, for example, lacZ promoter (Ward *et al.*, Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427), araB promoter (Better *et al.*, Science (1988) 240, 1041-1043), T7 promoter or such.
10 Such vectors include pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Quiagen), pEGFP, or pET (in this case, the host is preferably BL21 that expresses T7 RNA polymerase) in addition to the vectors described above.

The vectors may comprise signal sequences for antibody secretion. As a signal sequence for antibody secretion, a pelB signal sequence (Lei, S. P. *et al* J. Bacteriol. (1987) 169, 15 4379) may be used when a protein is secreted into the *E. coli* periplasm. The vector can be introduced into host cells by calcium chloride or electroporation methods, for example.

In addition to vectors for *E. coli*, the vectors for producing the antibodies of the present invention include mammalian expression vectors (for example, pcDNA3 (Invitrogen), pEF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322), pEF, and pCDM8), insect cell-derived expression
20 vectors (for example, the "Bac-to-BAC baculovirus expression system" (Gibco-BRL) and pBacPAK8), plant-derived expression vectors (for example, pMH1 and pMH2), animal virus-derived expression vectors (for example, pHSV, pMV, and pAdexLcw), retroviral expression vectors (for example, pZIPneo), yeast expression vectors (for example, "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNV11, and SP-Q01), and *Bacillus subtilis* expression vectors (for
25 example, pPL608 and pKTH50), for example.

When aiming for expression in animal cells such as CHO, COS, and NIH3T3 cells, the vectors must have a promoter essential for expression in cells, for example, SV40 promoter (Mulligan *et al.*, Nature (1979) 277, 108), MMLV-LTR promoter, EF1 α promoter (Mizushima *et al.*, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322), and CMV promoter, and more preferably they have a
30 gene for selecting transformed cells (for example, a drug resistance gene that allows evaluation using an agent (neomycin, G418, or such). Vectors with such characteristics include pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV, and pOP13, for example.

In addition, the following method can be used for stable gene expression and gene amplification in cells: CHO cells deficient in a nucleic acid synthesis pathway are introduced
35 with a vector (for example, pSV2-dhfr (Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)) that carries a DHFR gene which compensates for the deficiency, and

the vector is amplified using methotrexate (MTX). Alternatively, the following method can be used for transient gene expression: COS cells with a gene expressing SV40 T antigen on their chromosome are transformed with a vector (pcD and such) with an SV40 replication origin. Replication origins derived from polyoma virus, adenovirus, bovine papilloma virus (BPV), and such can also be used. To amplify gene copy number in host cells, the expression vectors may further carry selection markers such as aminoglycoside transferase (APH) gene, thymidine kinase (TK) gene, *E. coli* xanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Ecogpt) gene, and dihydrofolate reductase (dhfr) gene.

Desired antibodies obtained by the methods described above can be isolated from inside host cells or from outside the cells (the medium, or such), and purified to homogeneity. The antibodies can be isolated and purified by methods routinely used for isolating and purifying antibodies, and the type of method is not limited. For example, the antibodies can be isolated and purified by appropriately selecting and combining column chromatography, filtration, ultrafiltration, salting out, solvent precipitation, solvent extraction, distillation, immunoprecipitation, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectrofocusing, dialysis, recrystallization, and such.

The chromatographies include, for example, affinity chromatography, ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel filtration, reverse phase chromatography, and adsorption chromatography (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). The chromatographic methods described above can be conducted using liquid chromatography, for example, HPLC and FPLC. Columns that can be used for affinity chromatography include protein A columns and protein G columns. Columns using protein A include, for example, Hyper D, POROS, and Sepharose FF (GE Amersham Biosciences). The present invention comprises antibodies that are highly purified using these purification methods.

The present invention also provides agents for preventing or treating inflammatory diseases, which comprise as active ingredients fragments and/or modification products of an antibody of the present invention. The fragments and/or modification products of antibodies of the present invention include antibody fragments lacking some portions of the antibodies of the present invention (whole antibodies (for example, whole IgG), recombinant antibodies (for example, chimeric antibodies, humanized antibodies, and human antibodies), and minibodies (for example, scFv antibodies)), and are not particularly limited as long as they retain the ability to bind to their antigens. The antibody fragments of the present invention are not particularly limited, as long as they are portions of whole antibodies. The fragments preferably comprise a heavy chain variable region (VH) and/or a light chain variable region (VL). The amino acid sequence of the VH or VL may comprise substitutions, deletions, additions, and/or insertions.

The VH and/or VL may lack some portions, as long as the ability to bind to the antigen is retained. Furthermore, the variable region may be chimerized or humanized. Specifically, antibody fragments include, for example, Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv. Such antibody fragments can be obtained by constructing genes encoding the antibody fragments, introducing them into expression vectors, and then expressing them in appropriate host cells (see for example, Co, M. S. *et al.*, J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. *et al.*, Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137).

Furthermore, the antibodies of the present invention may be conjugated antibodies which are linked to any of various molecules, such as polyethylene glycol (PEG), radioactive substances, fluorescent substances, luminescent substances, enzymes, and toxins. Such conjugated antibodies can be obtained by chemically modifying the obtained antibodies. Methods for modifying antibodies have been established in this field (for example, US 5057313 and US 5156840). The "antibodies" of the present invention also include such conjugated antibodies.

The antibody's activity of binding to NR 10 can be determined by methods known to those skilled in the art. Methods for determining the antigen-binding activity of an antibody include, for example, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), EIA (enzyme immunoassay), RIA (radioimmunoassay), and fluorescent antibody method. For example, when enzyme immunoassay is used, antibody-containing samples, such as purified antibodies and culture supernatants of antibody-producing cells, are added to antigen-coated plates. A secondary antibody labeled with an enzyme, such as alkaline phosphatase, is added and the plates are incubated. After washing, an enzyme substrate, such as p-nitrophenyl phosphate, is added, and the absorbance is measured to evaluate the antigen-binding activity.

Furthermore, the NR 10-neutralizing activity of an antibody can be determined, for example, by the method described in Examples, which involves testing the effect of suppressing the growth of the IL-31-dependent cell line.

The NR 10 antagonists or antibodies having NR 10-neutralizing activity of the present invention can be used in the agents for preventing or treating inflammatory diseases. The present inventors proved that administration of mouse NR 10 neutralizing antibodies produced marked therapeutic effects in model animals for various inflammatory diseases. Furthermore, the expression of human NR 10 has been reported to be enhanced in thickened epidermis of atopic dermatitis patients (Non-patent Document 1). The present inventors confirmed by immunohistochemical staining that, as with the case of humans, the expression of mouse NR 10 was enhanced in thickened epidermis of auricles in the above-described chronic dermatitis model

mice (Example 5). These findings suggest that NR 10 is similarly involved in inflammatory diseases in all animal species, and that, like mouse NR 10 neutralizing antibodies, antibodies neutralizing human NR 10 are effective in preventing and treating various inflammatory diseases. Furthermore, as with the findings described in this Example, NR 10 antagonists other than antibodies are also expected to have therapeutic effects on various inflammatory diseases.

In the present invention, inflammatory disease refers to diseases with pathological features involved in cytological and histological reactions that occur in affected blood vessels and adjacent tissues in response to an injury or abnormal stimulation caused by physical, chemical, or biological agents (Stedman's Medical Dictionary, 5th Ed., MEDICAL VIEW CO., 2005). Generally, inflammatory diseases include, dermatitis (atopic dermatitis, chronic dermatitis, and such), inflammatory bowel diseases (colitis and such), asthma, arthritis (rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and such), bronchitis, Th2 autoimmune diseases, systemic lupus erythematosus, myasthenia gravis, chronic GVHD, Crohn's disease, spondylitis deformans, lumbar pain, gout, inflammation after surgery or injury, swelling, neuralgia, laryngopharyngitis, cystitis, hepatitis (non-alcoholic steatohepatitis, alcoholic hepatitis, and such), hepatitis B, hepatitis C, and arteriosclerosis.

Preferred examples of inflammatory diseases that are subjects of the present invention include atopic dermatitis, chronic dermatitis, rheumatism, osteoarthritis, and chronic asthma.

The present inventors discovered that NR 10 antagonist antibodies have therapeutic effects against atopic dermatitis, chronic dermatitis, rheumatism, and osteoarthritis. On the other hand, it was revealed that NR 10 antagonist antibodies do not produce therapeutic effects in acute contact dermatitis and DSS acute colitis models.

The agents for preventing or treating inflammatory diseases of the present invention comprise as an active ingredient an NR 10 antagonist or an antibody having NR 10-neutralizing activity described above. The phrase "comprises an NR 10 antagonist as an active ingredient" means comprising an NR 10 antagonist as at least one of the active ingredients, and does not limit the contents. In addition, the agents for preventing or treating inflammatory diseases of the present invention may also comprise, in combination with an NR 10 antagonist, other ingredients that enhance the prevention or treatment of the inflammatory disease.

The NR 10 antagonist of the present invention can be formulated according to standard methods (see, for example, Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, USA). Further, they may comprise pharmaceutically acceptable carriers and/or additives if necessary. For example, they may contain surfactants (for example, PEG and Tween), excipients, antioxidants (for example, ascorbic acid), coloring agents, flavoring agents, preservatives, stabilizers, buffering agents (for example, phosphoric acid, citric acid, and other organic acids), chelating agents (for example, EDTA), suspending agents, isotonicizing

agents, binders, disintegrators, lubricants, fluidity promoters, and corrigents. However, the carriers that can be comprised in the agents for preventing or treating inflammatory diseases of the present invention are not limited to this list. In fact, other commonly used carriers such as light anhydrous silicic acid, lactose, crystalline cellulose, mannitol, starch, carmelose calcium, carmelose sodium, hydroxypropylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, polyvinylacetaldietethylaminoacetate, polyvinylpyrrolidone, gelatin, medium chain fatty acid triglyceride, polyoxyethylene hydrogenated castor oil 60, sucrose, carboxymethylcellulose, corn starch, inorganic salt, and so on, can be appropriately comprised. The compositions may also comprise other low-molecular-weight polypeptides, proteins such as serum albumin, gelatin, and immunoglobulin, and amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine, and lysine. When the composition is prepared as an aqueous solution for injection, NR 10 antagonists may be dissolved in an isotonic solution comprising, for example, physiological saline, dextrose, and other adjuvants. The adjuvants may include, for example, D-sorbitol, D-mannose, D-mannitol, and sodium chloride. In addition, appropriate solubilizing agents, for example, alcohols (for example, ethanol), polyalcohols (for example, propylene glycols and PEGs), and non-ionic detergents (polysorbate 80 and HCO-50) may be used concomitantly.

If necessary, NR 10 antagonists may be encapsulated in microcapsules (microcapsules made of hydroxycellulose, gelatin, polymethylmethacrylate, and the like), and made into components of colloidal drug delivery systems (liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles, and nano-capsules) (for example, see "Remington's Pharmaceutical Science 16th edition" & Oslo Ed. (1980)). Moreover, methods for making sustained-release drugs are known, and these can be applied for NR 10 antagonists (Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. (1981) 15, 167-277; Langer, Chem. Tech. (1982) 12, 98-105; US Patent No. 3,773,919; European Patent Application (EP) No. 58,481; Sidman *et al.*, Biopolymers (1983) 22, 547-56; EP 133,988).

The agents for preventing or treating inflammatory diseases of the present invention can be administered either orally or parenterally, but are preferably administered parenterally. Specifically, the agents are administered to patients by injection or percutaneous administration. Injections include, for example, intravenous injections, intramuscular injections, and subcutaneous injections, for systemic or local administration. The agents may be given to sites where inflammation is to be suppressed, or areas surrounding the sites by local infusion, intramuscular injection in particular. The administration methods can be properly selected according to the patient's age and condition. The single-administration dose can be selected, for example, from within the range of 0.0001 to 100 mg of the active ingredient per kg body weight. Alternatively, when the agents are administered to human patients, the dose of the active ingredient can be selected from within the range of 0.001 to 1,000 mg/kg body weight.

The single-administration dose preferably comprises, for example, NR 10 antagonist at about 0.01 to 50 mg/kg body weight. However, the dose of an agent for preventing or treating inflammatory diseases of the present invention is not limited to these examples.

5 The present invention also provides antibodies having NR 10-neutralizing activity (including fragments of antibodies having NR 10-neutralizing activity, and/or modification products thereof; the same definition is used throughout the description below). The antibodies having NR 10-neutralizing activity of the present invention are useful as active ingredients in the above-described agents for preventing or treating inflammatory diseases. The antibodies having NR 10-neutralizing activity of the present invention may be polyclonal or monoclonal
10 antibodies, but are preferably monoclonal antibodies. Such monoclonal antibodies having NR 10-neutralizing activity can be obtained by the methods described above. The monoclonal antibodies of the present invention have the activity of neutralizing NR 10 derived from mammals or fragments thereof, preferably have the activity of neutralizing NR 10 derived from humans or mice, or fragments thereof, and more preferably the activity of neutralizing NR 10
15 derived from humans or fragments thereof. Human NR 10 or a peptide fragment thereof may be used as an immunogen to prepare monoclonal antibodies having the activity of neutralizing human NR 10. Alternatively, the antibodies having NR 10-neutralizing activity of the present invention may be recombinant antibodies. Recombinant antibodies having NR 10-neutralizing activity of the present invention include, but are not limited to, chimeric antibodies, humanized
20 antibodies, human antibodies, and minibodies.

In the present invention, the antibodies having NR 10-neutralizing activity include, for example, anti-mouse NR 10 antibodies that comprise a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3.

25 The present invention also includes monoclonal antibodies having the activity of neutralizing human NR 10. The monoclonal antibodies having the activity of neutralizing human NR 10 of the present invention can be obtained by preparing monoclonal antibodies using human NR 10 or a peptide fragment thereof as an immunogen, and then selecting from the anti-human NR 10 monoclonal antibodies, antibodies that have the activity of neutralizing
30 human NR 10, based on the above-described assay system using the IL-31-dependent cell line.

In the present invention, the antibodies having the activity of neutralizing human NR 10 include the antibodies described in any one of:

- (a) antibodies having a heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 that consist of the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 18, 19, and 20, respectively.
- 35 (b) antibodies having a light chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 that consist of the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 21, 22, and 23, respectively;

(c) antibodies having the heavy chain variable region of (a) and the light chain variable region of (b); and

(d) antibodies that recognize the same epitope as that recognized by the antibodies of any one of (a) to (c).

5 Whether an antibody recognizes the same epitope as that recognized by another antibody can be confirmed by the competition between the two antibodies against the epitope. Competition between the antibodies can be evaluated by competitive binding assays using means such as ELISA, fluorescence energy transfer method (FRET), and fluorometric microvolume assay technology (FMAT(R)). The amount of antibodies bound to an antigen indirectly
10 correlate with the binding ability of candidate competitor antibodies (test antibodies) that competitively bind to the same epitope. In other words, as the amount of or the affinity of test antibodies against the same epitope increases, the amount of antibodies bound to the antigen decreases, and the amount of test antibodies bound to the antigen increases. Specifically, appropriately labeled antibodies and antibodies to be evaluated are simultaneously added to the
15 antigens, and the thus bound antibodies are detected using the label. The amount of antibodies bound to the antigen can be easily determined by labeling the antibodies beforehand. This label is not particularly limited, and the labeling method is selected according to the assay technique used. The labeling method includes fluorescent labeling, radiolabeling, enzymatic labeling, and such.

20 For example, fluorescently labeled antibodies and unlabeled antibodies or test antibodies are simultaneously added to animal cells expressing NR 10, and the labeled antibodies are detected by fluorometric microvolume assay technology.

IC_{50} is the concentration in which the amount of labeled antibodies bound to the epitope is reduced to 50% by the binding of unlabeled antibodies. Herein, antibodies that recognize the
25 same epitope are antibodies that can reduce the amount of labeled antibodies bound to the epitope to at least 50% when the concentration of test antibodies is ten times higher than the IC_{50} of the unlabeled antibodies.

 Antibodies having the activity of neutralizing human NR 10 that are used in the present invention preferably further have binding activity to cynomolgus monkey NR 10, and more
30 preferably have the activity of neutralizing cynomolgus monkey NR 10. The cynomolgus monkey NR 10 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 24 can be used in measurements of the activity of neutralizing or binding to cynomolgus monkey NR 10.

 The present invention also provides the therapeutic methods described below. The interpretation of NR 10, antagonists, monoclonal antibodies, recombinant antibodies,
35 inflammatory diseases, and others in the methods are as described above.

(1) a method for preventing or treating an inflammatory disease, which comprises the step of

administering an NR 10 antagonist to a patient with an inflammatory disease;

(2) the method of (1), in which the NR 10 antagonist is an antibody having the activity of binding to NR 10;

(3) the method of (2), in which the antibody is a monoclonal antibody;

5 (4) the method of (2), in which the antibody is a monoclonal antibody that binds to human NR 10;

(5) the method of any one of (2) to (4), in which the antibody is a recombinant antibody;

(6) the method of (5), in which the recombinant antibody is a chimeric antibody, humanized antibody, or human antibody;

10 (7) the method of any one of (2) to (6), in which a fragment of an antibody having NR 10-neutralizing activity and/or a modified product thereof are included as an active ingredient;

(8) the method of any one of (1) to (7), in which the inflammatory disease is atopic dermatitis;

(9) the method of any one of (1) to (7), in which the inflammatory disease is chronic dermatitis;

(10) the method of any one of (1) to (7), in which the inflammatory disease is rheumatism; and

15 (11) the method of any one of (1) to (7), in which the inflammatory disease is osteoarthritis.

The present invention also provides the inventions described below. The explanation of NR 10, antagonists, monoclonal antibodies, recombinant antibodies, inflammatory diseases, and others in the methods are as described above.

(1) use of an NR 10 antagonist to produce an agent for preventing or treating an inflammatory
20 disease;

(2) the use of (1), in which the NR 10 antagonist is an antibody having the activity of binding to NR 10;

(3) the use of (2), in which the antibody is a monoclonal antibody;

(4) the use of (2), in which the antibody is a monoclonal antibody that binds to human NR 10;

25 (5) the use of any one of (2) to (4), in which the antibody is a recombinant antibody;

(6) the use of (5), in which the recombinant antibody is a chimeric antibody, humanized antibody, or human antibody;

(7) the use of any one of (2) to (6), in which a fragment of an antibody having NR 10-neutralizing activity and/or a modification product thereof are included as an active
30 ingredient;

(8) the use of any one of (1) to (7), in which the inflammatory disease is atopic dermatitis;

(9) the use of any one of (1) to (7), in which the inflammatory disease is chronic dermatitis;

(10) the use of any one of (1) to (7), in which the inflammatory disease is rheumatism; and

(11) the use of any one of (1) to (7), in which the inflammatory disease is osteoarthritis.

35 All prior-art documents cited herein are incorporated by reference herein.

Examples

Herein below, the present invention will be specifically described with reference to Examples, but it is not to be construed as being limited thereto.

5 [Example 1] Establishment of Ba/F3 cell line that express NR 10 and OSMR

A human NR 10 cDNA (SEQ ID NO: 1 of WO 0075314) was inserted into the expression vector pCOS1 (Biochem Biophys Res Commun. 228, p838-45, 1996) to produce pCosNR 10.3. An oncostatin M receptor cDNA (OSMR, GenBank accession No. NM003999) was isolated from a human placental library by PCR, and then the expression vector
10 pCos1-hOSMR was similarly constructed. By electroporation, 10 µg each of the vectors were simultaneously introduced into cells of the cell line Ba/F3 derived from mouse IL-3-dependent pro-B cells (BioRad Gene Pulser; 960 µF and 0.33 kV). After introduction, human IL-31 was added and the cells were cultured. Thus, a cell line that proliferated in an IL-31-dependent fashion was obtained. Likewise, a mouse-IL-31-dependent cell line was also prepared from
15 Ba/F3 cells that were made to express the mouse NR 10 and OSMR genes.

In both cell lines, ED50 was found to be several ng/ml. Thus, well-proliferating cell lines were obtained. The human-IL-31-dependent cell line exhibited no response to mouse IL-31, and the growth was suppressed upon addition of human NR 10 protein (extracellular domain). The mouse-IL-31-dependent cell line exhibited no response to human IL-31, and the
20 growth was not suppressed by the added mouse NR 10 protein (extracellular domain).

[Example 2] Preparation of NR 10 protein (extracellular domain)

The extracellular domain alone was amplified by PCR using NR 10 cDNA as a template, a FLAG tag sequence was attached to the C terminus, and was inserted into the expression vector
25 pCXND3 (WO 2005/005636) (pCXND3-NR 10-flag). 10 µg of this linear vector was introduced into cells of Chinese hamster ovary cell line DG44 by electroporation (BioRad Gene PulserII; 25 µF and 1.5 kV). A high expression cell line was obtained. A purified sample was prepared from a supernatant of large-scale culture of the cell line by anti-FLAG antibody column (SIGMA) and gel filtration, and used in the experiments described below. Mouse NR 10
30 (extracellular domain) with FLAG tag sequence attached to the C terminus was similarly prepared.

[Example 3] Isolation of scFv having anti-mouse NR 10 neutralizing activity, and preparation of BM095 as a chimerized IgG

35 Specifically, the present inventors tried to narrow down the candidate clones from a human antibody phage library by panning using biotinylated mouse NR 10 protein (extracellular

domain). Secretory scFv were purified from the clones, and added to the cell growth assay system using IL-31-dependent Ba/F3 cells described in Example 1. As a result, the clone BM095 exhibiting strong growth-suppressing activity was successfully obtained.

Using PCR, the human H chain variable region (VH) sequence of BM095 was linked to mouse IgG2a constant region (after CH1), and human L chain variable region (VL) sequence of BM095 was linked to mouse λ chain constant region, to construct an expression vector. The amino acid sequence of the VH is shown in SEQ ID NO: 1, and the nucleotide sequence encoding the amino acid sequence is shown in SEQ ID NO: 2. The amino acid sequence of the VL is shown in SEQ ID NO: 3, and the nucleotide sequence encoding the amino acid sequence is shown in SEQ ID NO: 4. The respective linear expression vectors were simultaneously introduced into the cell line DG44, and then a cell line expressing chimerized IgG at a high level was selected. A purified sample was obtained from a supernatant of a large-scale culture of this cell line using a protein A (rProtein A Sepharose Fast Flow, GE Amersham Biosciences) column and cation-exchange column chromatography (SP-TOYOPEARL 650M, TOSOH).

Furthermore, pyrogen was removed using ActiClean Etox (Sterogen) resin to reduce the concentration to below the detection limit. The sample was used in the animal experiments described below. A result obtained by adding BM095 to the assay system described above is shown in Fig. 1.

[Example 4] Assessment of drug efficacy in an atopic dermatitis model using NC/Nga mice

A dermatitis model was produced by repeated application of picryl chloride (PiCl) at weekly intervals. Specifically, 4 days after sensitization with 5% PiCl (150 μ l) on the abdomen and footpad, the induction of dermatitis was achieved by repeated application of 0.8% PiCl (150 μ l) on the back and auricle at weekly intervals. The resulting symptoms were observed twice a week over the third to sixth week period, and five perspectives ((1) pruritus, (2) redness and bleeding, (3) edema, (4) injury and tissue damage, and (5) incrustation and dryness) were independently scored on a scale of 0 to 3. The antibody was administered at 10 mg/kg into the peritoneal cavities the day before sensitization and each induction, 6 times in total (BM095 group), or the day before each induction after the third week, three times in total (V/B group).

As a positive control, 1 mg/kg dexamethasone was orally administered every day after the third week (DEX group). Each group contained 10 male NC/Nga mice.

As shown in Fig. 2, a significant suppressive effect was found in the antibody-administered group as compared to the solvent-administered vehicle group. In addition, as seen in Fig. 2, whereas significant weight loss was found in the DEX group, there was no weight change in the antibody-administrated group. This suggests that the antibody is a very safe agent.

[Example 5] Assessment of drug efficacy using a chronic dermatitis model created by repeated application of picryl chloride

5 Six-week-old female BALB/c mice were sensitized by applying 20 μ l of 0.5% picryl chloride (acetone/olive oil (1:4 v/v) solution) on their right ears. The induction was achieved by repeatedly applying 20 μ l of 0.25% picryl chloride (acetone/olive oil (1:4 v/v)) on their right ears every two days since the eighth day after sensitization. 10 mg/kg of BM095 was administered into the peritoneal cavities once a week since the day before sensitization in the group for evaluation of the preventive effect of BM095 or since the 20th day after the start of induction in the group for evaluation of the therapeutic effect of BM095. Auricle swelling was evaluated by sequentially measuring the thickness of right ear using a dial thickness gauge.

As a result, a significant suppressive effect was found in the antibody-administered group, as seen in Fig. 4. The expression of human NR 10 was reported to be enhanced in thickened epidermis of atopic dermatitis patients (Non-patent Document 1). Auricles of the above-described chronic dermatitis model mice were immunohistochemically stained. As with the case of humans, the expression of mouse NR 10 was observed to be enhanced in the thickened epidermis (Fig. 5; BM095 in which the constant region was replaced with that of human IgG was prepared in Example 3 and used in immunohistochemical staining. Portions stained brown are NR 10 expression sites). This finding suggests that NR 10 is similarly involved in inflammatory diseases in both human and mouse.

[Example 6] Assessment of drug efficacy using collagen-induced arthritis (rheumatism) model

Preparation of model mice and evaluation of drug efficacy were achieved by the procedure described below.

25 140 μ l of collagen gel, which was prepared by combining equal amounts of Complete Adjuvant H37Ra and 0.3% type II collagen derived from bovine joint, was administered intracutaneously to 9-week old female DBA/1JN mice at the tail head (Day 0; sensitization). After three weeks, collagen gel prepared by the same procedure was administered intracutaneously on the back to induce the onset of arthritis (Day 21; induction). According to the body weights two days before sensitization (Day -2), 16 mice were divided into two groups, each including 8 mice, to set a medium-administered group and a BM095-administered group. Using as a medium 20 mmol/l acetate buffer (pH 5.5) (200 mmol/l NaCl) diluted 6 times with PBS, the test substance BM095 was administered intravenously to the 8 mice of the BM095-administered group at the dose of 10 mg/weight kg the day before sensitization (Day -1). Meanwhile, the same volume of the medium per unit body weight was administered to the 8 mice in the medium-administered group as a control on Day -1. Swelling in the four limbs was

observed and evaluated by scoring (on a scale of 0 to 4 for each limb: total score 16) since the day before induction (Day 20) at 2- to 3-day intervals.

As a result, the score for swelling in the four limbs was found to decrease after Day 20 in the BM095-administered group, as seen in Fig. 6. This suggests that BM095 has the effect of suppressing the onset of arthritis.

[Example 7] Assessment of drug efficacy using collagenase-induced arthritis (osteoarthritis) model

Preparation of model mice and evaluation of drug efficacy were achieved by the procedure described below.

A control medium (20 mmol/l acetate buffer (pH 5.5) diluted 6 times with PBS, 200 mmol/l NaCl (n=5)), 2 mg/kg BM095 (n=5), and 20 mg/kg BM095 (n=6) were administered (5 ml/kg) intravenously into the caudal veins of 8-week-old male C57BL/6J Jcl mice (CLEA Japan Inc.). Then, 6 μ l of 1.5% collagenase solution (Type II; Sigma) filtered through 0.45- μ m filter (MILLIPORE) was administered into the right knee joint cavities under anesthesia with inhalation of 3% isoflurane (Am J Pathol 1989; 135(6):1001-14).

The widths of right and left knee joints were determined using calipers (Mitsutoyo CO.) immediately before collagenase administration and 3, 7, and 14 days after collagenase administration to calculate the difference between right and left. The difference was defined as a representative value for right knee joint swelling. The area under the curve (AUC) of transition of this difference was determined based on the trapezoidal rule, and defined as an indicator of drug efficacy. Student's t test was conducted for AUC of the medium control group and CNP-administered group using a statistical analysis software (SAS Institute Inc.) (a significant difference is assumed when $p < 0.05$). As a result, AUC of the BM095-administered group was significantly smaller at any dose than that of the medium control group, as seen in Fig. 7. This result demonstrates that BM095 suppresses arthritis in the osteoarthritis model.

[Example 8] Preparation of anti-human NR 10 neutralizing antibody

Mice were immunized with human NR 10 protein (extracellular domain) {described in Example 2}, and hybridomas were prepared by conventional methods. The culture supernatants of the hybridomas were assayed for the neutralizing activity using the human-IL-31-dependent cell line (hNR 10/hOSMR/BaF3 cells) described in Example 1. Multiple clones exhibiting strong NR 10 neutralizing activity were obtained (Fig. 8).

[Example 9] Preparation of human chimeric antibody

The amino acid sequence of the heavy chain variable region of NA633, which exhibited

the strongest activity among neutralizing antibodies, is shown in SEQ ID NO: 16, and the amino acid sequence of the light chain variable region is shown in SEQ ID NO: 17. In addition, the amino acid sequences of CDR1, CDR2, and CDR3 of the heavy chain variable region of NA633 are shown in SEQ ID NOs: 18, 19, and 20, respectively; and the amino acid sequences of CDR1, CDR2, and CDR3 of the light chain variable region are shown in SEQ ID NOs: 21, 22, and 23, respectively.

Furthermore, a chimeric antibody comprising the above-described mouse variable region and human constant region (IgG1-type H chain; κ -type L chain) was prepared by a conventional method, and the neutralizing activity was determined. As shown in Fig. 9, the chimeric antibody NA633 exhibited strong neutralizing activity at low concentrations.

[Example 10] Isolation of cynomolgus monkey NR 10

The inventors tried to isolate the cynomolgus monkey NR 10 gene, because the cross-reactivity and neutralizing activity to cynomolgus monkey NR 10 were thought to be important in safety assessment at the preclinical step. Primers were designed based on disclosed Rhesus monkey genomic information and such, and the NR 10 gene was successfully amplified from organs of cynomolgus monkey by PCR. An alignment of amino acid sequences of human NR 10 and the isolated cynomolgus monkey NR 10 is shown in Fig. 10. The amino acid sequence of the cynomolgus monkey NR 10 is shown in SEQ ID NO: 24. A cell line proliferating in a human-IL-31-dependent fashion was established by introducing the cynomolgus monkey NR 10 gene together with the human OSMR gene into Ba/F3 cells, as described in Example 1. The neutralizing activity of the chimeric antibody NA633 described in Example 9 was tested using this cell line. The result demonstrated that the antibody also exhibited strong neutralizing activity in cynomolgus monkey (Fig. 11).

[Reference Example 1] Drug efficacy of BM095 in dextran sulfate sodium (DSS) induced colitis

DSS-induced colitis model (J Immunol (2003) 171:5507-5513), which was reported as a pathological model for inflammatory bowel disease (IBD), was prepared to evaluate the effect of BM095, an anti-mouse NR 10 neutralizing antibody. An aqueous solution of 5% (w/v) Dextran Sulfate Sodium Salt (Wako Pure Chemical Industries) was prepared using distilled water filtered and sterilized with 0.22- μ m filter (Millipore). Six-week old male Balb/cAnN Crj mice (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN) were allowed to freely drink the solution from water bottles for 7 days. The body weights were measured, and percent weight changes relative to the weights on the first day of DSS administration were used as an index of drug efficacy.

Using this model, the anti-mouse NR 10 neutralizing antibody BM095 was

intravenously administered at a dose of 10 mg/kg the day before DSS administration and the resulting weight loss was evaluated (n=10) to test whether the pathological condition was improved by neutralizing IL-31 signaling. The group (Vehicle group; n=10) in which a vehicle (a mixture of acetate buffer [20 mmol/L sodium acetate and 20 mmol/L sodium chloride] and phosphate-buffered saline [PBS; GIBCO], which were mixed at a volume ratio of 1:5) was administered intravenously the day before DSS administration, was used as a vehicle control group. Furthermore, the course of percent weight change in Balb/cAnN Crj mice of same sex and age (n=1) as those in the DSS-administered group was also investigated to know the time course of percent weight change in normal mice.

The course of weight is shown in Fig. 12. DSS administration reduced the percent weight change in the Vehicle group. The course of percent weight change in the BM095 administered group was similar to that in the Vehicle group. However, four and five days after DSS administration, the percent weight change was significantly reduced in the BM095 group as compared to the Vehicle group. These results showed that the administration of BM095 produced no therapeutic effect on colitis of the model.

It has been reported that the expression of IL-31RA is enhanced in this model (WO 2004/003140). The experimental results described above demonstrate that antibodies neutralizing the molecule produce no therapeutic effect on colitis of this model.

[Reference Example 2] Drug efficacy of BM095 in picryl chloride-induced acute contact dermatitis model

To evaluate the effect of the anti-mouse NR 10 neutralizing antibody BM095, a Dermatitis reported as an acute contact dermatitis model (Clin Immunol (2003) 108: 257-262) was developed. This Dermatitis is a result of a delayed hypersensitivity reaction due to sensitization and induction by picryl chloride application. 50 μ L of a solution of 7% picryl chloride (nacalai tesque, Inc.; ethanol:acetone = 3:1 (v/v)) was applied onto abdominal skin to sensitize 8-week old female Balb/cAnN Crj mice (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN), and after 5 days, 20 μ L of 1% picryl chloride solution (acetone:olive = 1:4 (v/v)) was applied onto the skin of right auricles to elicit contact dermatitis (Induction). 20 μ L of a vehicle (acetone:olive = 1:4 (v/v)) was applied onto the skin of left auricles of the same mice as a control to evaluate the effect of the vehicle on the thickness of auricle (Positive group; n=6). The thicknesses of right and left ears were measured using a Dial Thickness Gauge (OZAKI MFG.) immediately before induction and 24, 48, and 72 hours after induction, and the change in the thickness of auricle relevant to the thickness immediately before induction was used as an index for drug efficacy.

The group (Negative group; n=6) in which an ethanol-acetone mixture (3:1 (v/v))

without picryl chloride was applied onto the abdominal skin at the time of sensitization, and after 5 days, 20 μ L of 1% picryl chloride solution was applied onto the skin of right auricle and 20 μ L of a vehicle (acetone:olive = 1:4 (v/v)) was applied onto the skin of left auricle, was used as a control group to evaluate the establishment of pathological conditions.

5 The group (BM095 group; n=6), in which acute contact dermatitis was induced by the same method as that used for the above-described Positive group and then BM095 was administered intravenously at 10 mg/kg the days before sensitization and induction, and the group (Vehicle group; n=5) in which at the same timing a vehicle (acetate buffer [20 mmol/L sodium acetate and 20 mmol/L sodium chloride] and phosphate-buffered physiological saline
10 [PBS; GIBCO], which were combined at a volume ratio of 1:5) was administered, was used to evaluate the effect of administration of anti-NR 10 antibodies on the pathological conditions in the model system.

 The changes in auricle thickness up to 72 hours after induction are shown in Fig. 13. The auricle was found to be significantly thickened in the Positive group at each time point of 24,
15 48, and 72 hours after induction as compared to the Negative group, suggesting establishment of pathological conditions. The transition of auricle thickness in the BM095 group was similar to that in the Vehicle group, and thus, no significant suppression was found.

 The results described above demonstrate that the administration of BM095 produce no therapeutic effect on acute contact dermatitis observed in this model.

20

Industrial Applicability

 The present invention provides novel agents for preventing or treating inflammatory diseases. The agents for preventing or treating inflammatory diseases provided by the present invention comprise as an active ingredient an NR 10 antagonist, more preferably, an antibody
25 having NR 10-neutralizing activity.

 Monoclonal antibody-based anti-cytokine therapy is drawing much attention in recent years. In many actual pathological conditions, however, it has been difficult to produce therapeutic effects by blocking a single cytokine, because compensatory pathways are activated. Further, it was difficult to estimate in what type of diseases therapeutic effects could be obtained
30 by blocking the target cytokine. Under the circumstance described above, the present inventors discovered that anti-NR 10 neutralizing antibodies could significantly suppress symptoms in model mice with atopic dermatitis, chronic dermatitis, rheumatism, osteoarthritis or such.

 The present inventors also succeeded in preparing human NR 10 neutralizing antibodies. Agents for preventing or treating inflammatory diseases, which comprise as an active ingredient
35 human NR 10 neutralizing antibodies, are highly useful for clinical application to humans.

CLAIMS

1. An agent for preventing or treating an inflammatory disease, wherein the agent comprises an NR 10 antagonist as an active ingredient.
5
2. The preventive or therapeutic agent of claim 1, wherein the NR 10 antagonist is an antibody having an NR 10 neutralizing activity.
3. The preventive or therapeutic agent of claim 2, wherein the antibody is a monoclonal
10 antibody.
4. The preventive or therapeutic agent of claim 2, wherein the antibody is a monoclonal antibody having a human NR 10 neutralizing activity.
- 15 5. The preventive or therapeutic agent of any one of claims 2 to 4, wherein the antibody is a recombinant antibody.
6. The preventive or therapeutic agent of claim 5, wherein the recombinant antibody is a chimeric antibody, humanized antibody, or human antibody.
20
7. The preventive or therapeutic agent of any one of claims 2 to 6, wherein the agent comprises as an active ingredient a fragment and/or a modified fragment of the antibody with NR 10 neutralizing activity.
- 25 8. The preventive or therapeutic agent of any one of claims 1 to 7, wherein the inflammatory disease is atopic dermatitis.
9. The preventive or therapeutic agent of any one of claims 1 to 7, wherein the inflammatory disease is chronic dermatitis.
30
10. The preventive or therapeutic agent of any one of claims 1 to 7, wherein the inflammatory disease is rheumatism.
11. The preventive or therapeutic agent of any one of claims 1 to 7, wherein the inflammatory
35 disease is osteoarthritis.

12. An antibody having an NR 10 neutralizing activity.
13. The antibody of claim 12, which is a monoclonal antibody.
- 5 14. The antibody of claim 12, wherein NR 10 is human NR 10.
15. The antibody of any one of claims 12 to 14, which is a recombinant antibody.
- 10 16. The antibody of claim 15, wherein the recombinant antibody is a chimeric antibody, humanized antibody, or human antibody.
17. A fragment and/or a modified fragment of the antibody of any one of claims 12 to 16.
- 15 18. A method for preventing or treating an inflammatory disease, which comprises the step of administering an NR 10 antagonist to a patient with an inflammatory disease.
19. Use of an NR 10 antagonist to produce an agent for preventing or treating an inflammatory disease.

ABSTRACT

The present inventors obtained, from a phage library of human antibodies, an anti-mouse NR 10 neutralizing antibody-expressing BM095 clone that shows a strong proliferation-suppressing activity in an IL-31-dependent Ba/F3 cell proliferation assay system.

5 When this anti-mouse NR 10 neutralizing antibody was administered to NC/Nga mice, a model of atopic dermatitis which is a mouse model of chronic dermatitis that arises as a result of repeated applications of picryl chloride, a mouse model of rheumatoid arthritis, and a mouse model of osteoarthritis, a significant effect of symptom suppression was observed. This revealed that the anti-NR 10 neutralizing antibody is indeed effective as a therapeutic agent for

10 inflammatory diseases. In addition, the present inventors successfully obtained an anti-human NR 10 neutralizing antibody, providing extremely useful therapeutic agents with practical clinical applications.

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007 年12 月13 日 (13.12.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/142325 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) *A61P 21/04* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) *A61P 37/08* (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01) *C12N 15/02* (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2007/061625

(22) 国際出願日:

2007 年6 月8 日 (08.06.2007)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2006-160096 2006 年6 月8 日 (08.06.2006) JP

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GI, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 長谷川 雅一 (HASEGAWA, Masakazu) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 北村 秀智 (KITAMURA, Hidetomo) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 安達 秀樹 (ADACHI, Hideki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 糟谷 恵子 (KASUTANI, Keiko) [JP/JP];

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PREVENTIVE OR REMEDY FOR INFLAMMATORY DISEASE

(54) 発明の名称: 炎症性疾患の予防または治療剤

(57) Abstract: From a human antibody phage library, a clone BM095, which shows a potent proliferation inhibitory activity in an IL-31-dependent Ba/F3 cell proliferation assay system, is obtained. When administered to an atopic dermatitis model animal with the use of an Nc/Nga mouse, a model mouse of chronic dermatitis induced by the repeated application of picryl chloride, a rheumatoid arthritis model mouse and an arthritis deformans model mouse, this antimouse NR10 neutralizing antibody shows a remarkable effect of inhibiting the symptoms. Thus, it is clarified that this anti-NR10 neutralizing antibody is useful in practice as a remedy for inflammatory diseases. Moreover, antihuman NR10 neutralizing antibody is successfully acquired and thus a highly useful remedy which is clinically applicable in practice is provided.

(57) 要約: 本発明者らは、ヒト抗体ファージライブラリーから、IL-31依存性Ba/F3細胞増殖アッセイ系に於いて強い増殖抑制活性を示すクローンBM095を得た。この抗マウスNR10中和抗体を用いて、NC/Ngaマウスを用いたアトピー性皮膚炎モデルマウス、塩化ピクリルの繰返し塗布による慢性皮膚炎モデルマウス、リウマチ性関節炎モデルマウス、変形性関節症モデルマウスに投与したところ、顕著な症状の抑制効果が示され、実際に、抗NR10中和抗体が炎症性疾患治療薬として有用であることが明らかにされた。また、本発明者らは、抗ヒトNR10中和抗体の取得にも成功し、実際に臨床応用可能な、極めて有用な治療剤を提供した。

WO 2007/142325 A1

明 細 書

炎症性疾患の予防または治療剤

技術分野

- [0001] 本発明は、NR10アンタゴニストを有効成分として含有する、新規な炎症性疾患の予防または治療剤に関する。本発明はまた、NR10アンタゴニストを用いた炎症性疾患を予防または治療する方法に関する。

背景技術

- [0002] 種々の細胞の増殖分化、あるいは分化成熟した細胞の機能の賦活化に関与する液性因子として、数多くのサイトカインの存在が知られている。生体では、サイトカイン刺激を受けた細胞が別のサイトカインを産生し、複数のサイトカインによるネットワークが形成されている。生体の恒常性は、このネットワークが互いに調節し合うことによって、微妙なバランスの上に保たれている。多くの免疫炎症性の疾患は、これらのサイトカイン・ネットワークの破綻により生じると考えられ、モノクローナル抗体による抗サイトカイン療法が注目されている。例えば、抗TNF抗体や抗IL-6受容体抗体は、臨床で高い効果を示している。しかし一方で、実際の病態では代償経路が働き、IL-4等ひとつのサイトカインを遮断しただけでは治療効果が得られず、失敗した例も多い。
- [0003] 本発明者らは、IL-6のシグナル伝達受容体gp130に相同性の高い、新規サイトカイン受容体NR10の単離に成功した(特許文献1)。NR10は、オンコスタチンM受容体(OSMR)とヘテロダイマーを形成し、IL-31の受容体として機能する(非特許文献1)。Zymogenetics社は、IL-31を過剰発現させたトランスジェニック・マウスが掻痒性皮膚炎を自然発症することを報告した(特許文献2)。
- [0004] しかしながら、マウスにおけるサイトカインの強制発現や、病態マウスにおける血中のサイトカイン濃度の高さが、実際に疾患の原因となっていると断言することは出来ない。抗体によりシグナルを遮断した時に治療効果が得られるかは、全く不明である。例えば、IL-18をケラチノサイトで過剰発現させたトランスジェニック・マウスは、掻痒性皮膚炎を発症する。また、アトピー性皮膚炎自然発症モデルNC/Ngaマウスでは、血中のIL-18濃度が病態の進行とともに上昇する。これらから、IL-18の過剰発現が疾患

の原因として推察された。しかしながら、実際には、中和抗体投与による治療効果は認められなかった(非特許文献2)。

このように、サイトカインの発現が上昇している疾患において、そのサイトカインの機能を阻害したとしても必ずしも治療効果が得られる訳ではなく、サイトカインの発現量から実際に治療効果が得られる疾患を推測することは困難である。従って、ターゲットとするサイトカインのシグナル伝達の阻害により実際に治療効果が得られる疾患を見出すことが重要である。

なお、本発明の先行技術文献を以下に示す。

特許文献1:WO00/75314

特許文献2:WO03/060090

非特許文献1:IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis., J Allergy Clin Immunol. 2006 Feb; 117(2):418-25.

非特許文献2:Administration of anti-interleukin 18 antibody fails to inhibit development of dermatitis in atopic dermatitis-model mice NC/Nga., British Journal of Dermatology 149: 39-45, 2003

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明は上述の背景に鑑みてなされたものであり、本発明の課題は、サイトカイン受容体アンタゴニストによる炎症性疾患に対する抗サイトカイン療法を提供することである。より具体的には、本発明の課題は、抗NR10中和抗体により治療効果が得られる炎症性疾患を見出し、それらの疾患に対する新しい治療方法を提供することである。本発明はまた、ヒトに対する臨床応用が可能な抗ヒトNR10中和抗体を提供することも課題とする。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者らは上記課題を解決すべく、鋭意研究を行った。本発明者らは、様々な病態モデルマウスを対象とした抗マウスNR10中和抗体の薬効の評価を試みた。その結果、NC/Ngaマウスを用いたアトピー性皮膚炎モデルマウス、塩化ピクリルの繰返し

塗布による慢性皮膚炎モデルマウスにおいて、顕著な症状の抑制効果が示され、実際に、中和抗体が治療薬として有用であることが明らかにされた。また、リウマチのモデルであるコラーゲン関節炎および変形性関節症のモデルであるコラゲナーゼ関節炎においても症状を抑制する効果が確認された。これらの結果は、本願のNR10中和抗体が、慢性炎症の予防または治療に応用可能であることを示唆する。

さらに本発明者らは、ヒトNR10中和抗体の取得にも成功した。すなわち本発明は、以下の〔1〕～〔17〕を提供するものである。

〔1〕NR10アンタゴニストを有効成分として含有する、炎症性疾患の予防または治療剤。

〔2〕NR10アンタゴニストがNR10に対する中和活性を有する抗体である、〔1〕に記載の予防または治療剤。

〔3〕抗体がモノクローナル抗体である、〔2〕に記載の予防または治療剤。

〔4〕抗体がヒトNR10に対する中和活性を有するモノクローナル抗体である、〔2〕に記載の予防または治療剤。

〔5〕抗体が組換え抗体である、〔2〕～〔4〕のいずれかに記載の予防または治療剤。

〔6〕組換え抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、〔5〕に記載の予防または治療剤。

〔7〕NR10に対する中和活性を有する抗体の断片及び／又はその修飾物を有効成分として含有する、〔2〕～〔6〕のいずれかに記載の予防または治療剤。

〔8〕炎症性疾患がアトピー性皮膚炎である〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の予防または治療剤。

〔9〕炎症性疾患が慢性皮膚炎である〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の予防または治療剤。

〔10〕炎症性疾患がリウマチである〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の予防または治療剤。

〔11〕炎症性疾患が変形性関節症である〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の予防または治療剤。

〔12〕NR10に対する中和活性を有する抗体。

[13]モノクローナル抗体である、[12]に記載の抗体。

[14]NR10がヒトNR10である[12]に記載の抗体。

[15]組換え型抗体である、[12]～[14]のいずれかに記載の抗体。

[16]組換え型抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、[15]に記載の抗体。

[17][12]～[16]のいずれかに記載の抗体の断片及び／又はその修飾物。

[18]NR10アンタゴニストを炎症性疾患を呈する患者に投与する工程を含む、炎症性疾患を予防または治療する方法。

[19]炎症性疾患の予防または治療のために用いる剤の製造における、NR10アンタゴニストの使用。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]BM095をIL-31依存性Ba/F3細胞増殖アッセイ系に添加したときの、BM095による細胞増殖抑制効果を観察した結果を示すグラフである。横軸はアッセイ系中の推定mIL-31濃度、縦軸(OD450(450nmの吸光度))は細胞量を表す。凡例は、BM095添加量(単位:ng/mL)を示す。BM095添加量に依存して細胞増殖抑制効果が観察された。

[図2]アトピー性皮膚炎モデルマウスに抗NR10抗体を投与したときの治療効果を示すグラフである。陰性対照群(vehicle群)と比較し、抗NR10抗体投与群では有意な炎症抑制効果が確認された。

[図3]アトピー性皮膚炎モデルマウスに抗NR10抗体を投与したときの経時的体重変化を示すグラフである。既存抗炎症剤投与群では体重減少が観察されたにもかかわらず、抗NR10投与群では体重の変化が無く、抗NR10抗体の安全性が認められた。

[図4]慢性皮膚炎モデルマウスに抗NR10抗体を投与したときの治療効果を示すグラフである。抗NR10抗体投与群では、有意な耳介腫脹抑制効果が認められた。

[図5]慢性皮膚炎モデルのマウス耳介の免疫組織染色を示す写真である。ヒトと同様に、肥厚した表皮でマウスNR10の発現亢進が観察された。

[図6]コラーゲン誘発関節炎モデルマウスに抗NR10抗体を投与したときの関節炎発症抑制効果を示すグラフである。

[図7]コラゲナーゼ誘発関節炎(変形性関節症)モデルにおいて、BM095の投与濃度とAUCとの関係を示すグラフである。ここでAUCとは、左右の膝関節幅の差を右膝関節の腫脹を表す値とし、その推移の曲線下面積を意味する。

[図8]IL-31存在下におけるヒトNR10中和抗体(精製抗体)の濃度と細胞増殖抑制活性の相関を表すグラフである。抗体1、抗体2、抗体3は高いNR10中和活性を示した。

[図9]IL-31存在下におけるヒトNR10に対するキメラ抗体NA633の濃度と細胞増殖抑制活性の相関を表すグラフである。NA633は高いNR10中和活性を示した。

[図10]カニクイザルNR10とヒトNR10のアミノ酸配列を比較した図である。二重下線を付した配列は、細胞膜貫通領域を示している。

[図11]キメラNA633抗体の、ヒトIL-31刺激カニクイザルNR10/ヒトOSMR/BaF細胞株の細胞増殖抑制活性を示すグラフである。NA633はカニクイザルNR10にも中和活性を示した。

[図12]DSS大腸炎モデルマウスの体重変化率の推移を示すグラフである。

[図13]急性Picryl chrolide 接触性皮膚炎モデルの耳介の厚さの変化の推移を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0008] 本発明は、NR10アンタゴニストを活性成分として含有する炎症性疾患の予防または治療剤に関する。本発明は、本発明者らによって、NR10アンタゴニスト(例えば、抗NR10中和抗体)がアトピー性皮膚炎、慢性皮膚炎、リウマチ、変形性関節症等を発症したモデルマウスにおいてその症状の顕著な抑制効果が見出されたことに基づく。

[0009] NR10は、オンコスタチンM受容体(OSMR)とヘテロダイマーを形成し、IL-31の受容体として機能するタンパク質である。glm-r(J Biol Chem 277, 16831-6, 2002)、GPL(J Biol Chem 278, 49850-9, 2003)、IL-31RA(Nat Immunol 5, 752-60, 2004)などの名前としても知られており、本発明のNR10には、このような名前と呼ばれるタンパク質も含まれる。また本発明のNR10には、ヒトやマウス、その他の哺乳動物に由来するNR10も含まれ、特に限定されるものではないが、好ましいNR10としてヒトやマウス由来のNR10が挙げられる。ヒト由来のNR10として、複数のスプライシングバリエントが知

られている(WO00/075314)。上記スプライシングバリエントのうち、NR10.1は662アミノ酸からなり、細胞膜貫通領域を有することを特徴とする。また、NR10.2は、252アミノ酸配列からなる膜貫通領域を持たない可溶性受容体様タンパク質である。一方、細胞膜貫通型受容体タンパク質として機能するNR10スプライシングバリエントとして、NR10.3およびIL-31RAv3が知られている。本発明におけるヒトNR10は、オンコスタチンM受容体(OSMR)とヘテロダイマーを形成し、IL-31の受容体として機能するものであれば特に制限されるものではないが、好ましいNR10としてはNR10.3(ILRAv4とも呼ばれる(Nat Immunol 5, 752-60, 2004))およびIL-31RAv3を挙げることができる。NR10.3(IL-31RAv4)は662アミノ酸からなり(WO00/075314, Nat Immunol 5, 752-60, 2004)、IL-31RAv3は732アミノ酸からなる(GenBank Accession No: NM_139017)。IL-31RAv4のアミノ酸配列を配列番号:6に、IL-31RAv3のアミノ酸配列を配列番号:7に示す。一方、マウス由来のNR10としては、配列番号:5に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。

[0010] 本発明においてNR10アンタゴニストとは、NR10に結合することにより、NR10活性化に基づく細胞内シグナル伝達を遮断し、細胞の生理的活性を喪失させるまたは抑制する物質を意味する。ここで生理的活性としては、例えば、生理活性物質(例えば、ケモカイン、炎症性サイトカインなど)の産生誘導活性、産生抑制活性、分泌促進活性、分泌抑制活性、増殖活性、増殖誘導活性、生存活性、分化活性、分化誘導活性、転写活性、膜輸送活性、結合活性、タンパク質分解活性、リン酸化／脱リン酸化活性、酸化還元活性、転移活性、核酸分解活性、脱水活性、細胞死誘導活性、アポトーシス誘導活性などを挙げることができるが、これらに限定されるわけではない。

[0011] アンタゴニスト活性の有無の判定は当業者に公知の方法により行うことが可能である。例えば、細胞表面上に発現させたNR10に、リガンドの存在下で被検化合物を接触させ、NR10の活性化の指標となる細胞内シグナル伝達が生じるか否かを判定すればよい。このような判定は、例えば、文献「Dillon SR, et al., Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. Nat Immunol. 2004 Jul; 5(7):752-60.」に記載の方法によって行うことが可能である。リガンド刺激に応答した細胞内シグナル伝達を阻害する化合物は、NR10のアンタゴニストであると考えられる。

- [0012] 本発明におけるアンタゴニストは、天然の化合物であっても人工の化合物であってもよい。本発明におけるアンタゴニストとしては公知のものを用いることができる。また、上記方法によってアンタゴニスト活性を有すると判定された新規化合物を用いることもできる。
- [0013] 本発明におけるNR10アンタゴニストの1つの態様としては、NR10に対する中和活性を有する抗体が挙げられる。本発明における「NR10に対する中和活性を有する抗体」とは、NR10に基づく生理活性を抑制する作用を有する抗体を意味する。本発明における「NR10に対する中和活性を有する抗体」はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよいが、好ましい態様としてはモノクローナル抗体が挙げられる。
- [0014] NR10に対する中和活性を有するモノクローナル抗体は、たとえば、ヒトやマウス等の哺乳動物に由来するNR10またはその断片ペプチドを免疫原として、公知方法によって抗NR10モノクローナル抗体を調製した後、得られた抗NR10モノクローナル抗体の中からNR10中和活性を有する抗体を選別することにより、得ることが出来る。すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫する。得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞(ハイブリドーマ)をスクリーニングすることによって、抗NR10モノクローナル抗体を作製することが可能である。免疫される動物としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、サル、ヤギ、ロバ、ウシ、ウマ、ブタなどの哺乳動物を用いることができる。抗原の調製は、公知NR10遺伝子配列を用い、公知の方法、例えばバキュロウイルスを用いた方法(WO98/46777など)等に準じて行うことができる。NR10中和活性を有する抗体の選別は、例えば、実施例において後述するように、IL-31依存性細胞株に候補の抗体を添加したときの、該IL-31依存性細胞株の増殖抑制効果を観察する方法により、該抗体がNR10中和活性を有する抗体であるか判定することができる。上記方法においてIL-31依存性細胞株の増殖を抑制する抗体は、NR10に対する中和活性を有する抗体であると考えられる。
- [0015] ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法(Kohler, G. and Milstein,

C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46)等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行ってもよい。

[0016] 本発明のNR10に対する中和活性を有する抗体の好ましい態様として、ヒトNR10に対する中和活性を有するモノクローナル抗体が挙げられる。ヒトNR10に対する中和活性を有するモノクローナル抗体を作製するための免疫原としては、ヒトNR10に対する中和活性を有する抗体を作製できる限り、特に限定されない。例えばヒトNR10には複数のバリエーションの存在が知られるが、ヒトNR10に対する中和活性を有する抗体を作製できる限り、いずれのバリエーションを免疫原としてもよい。または同様の条件のもとに、NR10の断片ペプチドや、天然のNR10配列に人為的な変異を加えたものを免疫原としてもよい。ヒトNR10.3は、本発明のNR10に対する中和活性を有する抗体を作製するうえで、好ましい免疫原の一つである。

[0017] ここで、本発明の上記抗体は、NR10に対する中和活性を有するものであれば特に限定されず、キメラ(chimeric)抗体、ヒト化(humanized)抗体、ヒト抗体などの組換え抗体も含まれる。キメラ抗体とは、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体である。キメラ抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。例えば、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入することによって行うことが可能である(例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照)。具体的には、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域(V領域)のcDNAを合成する。目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望のヒト抗体定常領域(C領域)をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、ヒト抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、キメラ抗体を発現させることができる。

- [0018] ヒト化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域(CDR; complementarity determining region)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域(framework region; FR)を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号E P 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい(Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。
- [0019] また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる(特公平1-59878参照)。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる(国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照)。
- [0020] さらに、ヒト抗体ファージライブラリーを用いて、パニング法によりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体(scFv)としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を有する適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は周知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388

などを参考にすることができる。

[0021] 重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、NR10に対する中和活性を有する限り、NR10に対する中和活性が確認された抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されていてもよい。重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されており、NR10に対する中和活性を有する抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列を調製するための、当業者によく知られた方法としては、タンパク質に変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. *Gene* 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol.* 100, 468-500, Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M, and Fritz, HJ (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456, Kramer W, and Fritz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA *Methods. Enzymol.* 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82, 488-492) などを用いて、NR10に対する中和活性を有する抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列に適宜変異を導入することにより、NR10に対する中和活性を有する抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域と機能的に同等な変異体を調製することができる。このように、重鎖可変領域又は軽鎖可変領域において、1もしくは複数のアミノ酸が変異しており、NR10に対する中和活性を有する抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域もまた本発明の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域に含まれる。

[0022] アミノ酸残基を改変する場合には、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性アミノ酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、脂

肪族側鎖を有するアミノ酸(G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸(S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸(C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸(D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸(R、K、H)、及び、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(H、F、Y、W)を挙げることができる(括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)。これらの各グループ内のアミノ酸の置換を保存的置換と称す。あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている(Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984)81:5662-6; Zoller, M. J. and Smith, M., Nucleic Acids Res. (1982)10:6487-500; Wang, A. et al., Science(1984)224:1431-3; Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982)79:6409-13)。このような変異体は、本発明の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列と少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、そして、最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列の同一性を有する。本明細書において配列の同一性は、配列同一性が最大となるように必要に応じ配列を整列化し、適宜ギャップ導入した後、元となった重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列の残基と同一の残基の割合として定義される。アミノ酸配列の同一性は、上述の方法により決定することができる。

[0023] また、重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されており、NR10に対する中和活性を有する重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、該重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸にストリンジントな条件下でハイブリダイズする核酸から得ることも可能である。重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸にストリンジントな条件下でハイブリダイズする核酸を単離するための、ストリンジントなハイブリダイゼーション条件としては、6M 尿素、0.4%SDS、0.5 x SSC、37℃の条件またはこれと同等のストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件を例示できる。よりストリンジエンシーの高い条件、例えば、6M 尿素、0.4%SDS、0.1 x SSCの条件、42℃を用いれば、より相同

性の高い核酸の単離を期待することができる。単離した核酸の配列の決定は、後述の公知の方法によって行うことが可能である。単離された核酸の相同性は、塩基配列全体で、少なくとも50%以上、さらに好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、95%、96%、97%、98%、99%以上）の配列の同一性を有する。

[0024] 上記ハイブリダイゼーション技術を利用する方法にかえて、重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列情報を基に合成したプライマーを用いる遺伝子増幅法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を利用して、重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸を単離することも可能である。

[0025] 塩基配列及びアミノ酸配列の同一性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST (Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1993)90:5873-7)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al., J.Mol.Biol.(1990)215:403-10)。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore = 100、wordlength = 12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(NCBI (National Center for Biotechnology Information) の BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) のウェブサイト参照; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

[0026] また本発明における抗体は、低分子化抗体であってもよい。本発明の低分子化抗体は、全長抗体(whole antibody、例えばwhole IgG等)の一部分が欠損している抗体断片を含み、NR10への中和活性を有する限り特に限定されない。本発明の低分子化抗体は、全長抗体の一部分であれば特に限定されないが、重鎖可変領域(VH)又は軽鎖可変領域(VL)を含んでいることが好ましく、特に好ましくはVHとVLの両方を含む低分子化抗体である。

[0027] 本発明における低分子化抗体は、全長抗体よりも分子量が小さくなることが好ましいが、例えば、ダイマー、トリマー、テトラマーなどの多量体を形成すること等もあり、

全長抗体よりも分子量が大きくなることもある。

- [0028] 本発明における低分子化抗体の一つとして、scFv抗体を挙げることができる。scFv抗体は、重鎖可変領域([VH])及び軽鎖可変領域([VL])をリンカー等で結合して一本鎖ポリペプチドにした抗体である(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883、Plickthun「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」Vol.113, Resenbourg 及び Moore編, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994))。結合される重鎖可変領域と軽鎖可変領域の順序は特に限定されず、どのような順序で並べられていてもよく、例えば、以下のような配置を挙げることができる。

[VH]リンカー[VL]

[VL]リンカー[VH]

- [0029] 重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、置換、欠失、付加及び／又は挿入されていてもよい。さらに、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を会合させた場合に、抗原結合活性を有する限り、一部を欠損させてもよいし、他のポリペプチドを付加してもよい。又、可変領域はキメラ化やヒト化されていてもよい。

- [0030] 本発明において、抗体の可変領域を結合するリンカーは、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー、例えば、Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996に開示されるリンカーを用いることができる。

- [0031] 本発明において好ましいリンカーはペプチドリンカーである。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、通常、1～100アミノ酸、好ましくは3～50アミノ酸、更に好ましくは5～30アミノ酸、特に好ましくは12～18アミノ酸(例えば、15アミノ酸)である。

- [0032] ペプチドリンカーのアミノ酸配列としては、例えば、以下のような配列を挙げることができる。

Ser

Gly・Ser

Gly・Gly・Ser

Ser・Gly・Gly

Gly・Gly・Gly・Ser(配列番号:8)

Ser•Gly•Gly•Gly (配列番号:9)

Gly•Gly•Gly•Gly•Ser (配列番号:10)

Ser•Gly•Gly•Gly•Gly (配列番号:11)

Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Ser (配列番号:12)

Ser•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly (配列番号:13)

Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Ser (配列番号:14)

Ser•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly (配列番号:15)

(Gly•Gly•Gly•Gly•Ser (配列番号:10))_n

(Ser•Gly•Gly•Gly•Gly (配列番号:11))_n

[nは1以上の整数である]等を挙げることができる。

[0033] 合成化学物リンカー(化学架橋剤)は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)ジスクシンイミジルスベレート(DSS)、ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート(BS3)、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)(DSP)、ジチオビス(スルホスクシンイミジルプロピオネート)(DTSSP)、エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)(EGS)、エチレングリコールビス(スルホスクシンイミジルスクシネート)(スルホ-EGS)、ジスクシンイミジル酒石酸塩(DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩(スルホ-DST)、ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(BSOCOES)、ビス[2-(スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(スルホ-BSOCOES)などであり、これらの架橋剤は市販されている。

[0034] 本発明の抗体には、本発明の抗体のアミノ酸配列に複数個のアミノ酸残基が付加された抗体も含まれる。また、これら抗体と他のペプチド又はタンパク質とが融合した融合タンパク質も含まれる。融合タンパク質を作製する方法は、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドと他のペプチド又はポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明の抗体との融合に付される他のペプチド又はポリペプチドとしては、例えば、FLAG(Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis(ヒスチジン)残基からなる6×His、10×Hi

s、インフルエンザ凝集素(HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、 α -tubulinの断片、B-tag、Protein C の断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明の抗体との融合に付される他のポリペプチドとしては、例えば、GST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、HA(インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 β -ガラクトシダーゼ、MBP(マルトース結合タンパク質)等が挙げられる。市販されているこれらペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドと融合させ、これにより調製された融合ポリヌクレオチドを発現させることにより、融合ポリペプチドを調製することができる。

[0035] 本発明の抗体は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態などが異なり得る。しかしながら、得られた抗体が、本発明の抗体と同等の機能を有している限り、本発明に含まれる。例えば、本発明の抗体を原核細胞、例えば大腸菌で発現させた場合、本来の抗体のアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が付加される。本発明の抗体はこのような抗体も包含する。

[0036] 本発明の抗体は当業者に公知の方法により作製することができる。例えば、NR10を認識する抗体の配列を基に、当業者に公知の遺伝子組換え技術を用いて作製することが可能である。具体的には、NR10を認識する抗体の配列を基に抗体をコードするポリヌクレオチドを構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

[0037] ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。本発明の抗体を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクタ

ーが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター(Wardら, Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーター(Betterら, Science (1988) 240, 1041-1043)、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1(ファルマシア製)、「QIAexpress system」(キアゲン製)、pEGFP、またはpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)などが挙げられる。

[0038] また、ベクターには、抗体分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列(Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379)を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

[0039] 大腸菌以外にも、例えば、本発明の抗体を製造するためのベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター(例えば、pcDNA3(インビトロゲン社製)や、pEF-BOS(Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322)、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター(例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(ギブコBRL製)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター(例えばpMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター(例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター(例えば、pZIPneo)、酵母由来の発現ベクター(例えば、「Pichia Expression Kit」(インビトロゲン製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター(例えば、pPL608、pKTI150)が挙げられる。

[0040] CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター(Mulliganら, Nature (1979) 277, 108)、MMLV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター(Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子(例えば、薬剤(ネオ

マイシン、G418など)により判別できるような薬剤耐性遺伝子)を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

[0041] さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター(例えば、pSV2-dhfr(「Molecular Cloning 2nd edition」 Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989))など)を導入し、メトトレキセート(MTX)により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター(pcDなど)で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス(BPV)等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ(APH)遺伝子、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Ecogpt)遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子等を含むことができる。

[0042] これにより得られた本発明の抗体は、宿主細胞内または細胞外(培地など)から単離し、実質的に純粋で均一な抗体として精製することができる。抗体の分離、精製は、通常の抗体の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば抗体を分離、精製することができる。

[0043] クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。アフィニティー

クロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose FF (GE Amersham Biosciences) 等が挙げられる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製された抗体も包含する。

[0044] また本発明は、上記本発明の抗体の断片及び／又はその修飾物を有効成分として含有する、炎症性疾患の予防または治療剤を提供する。本発明の抗体の断片及び／又はその修飾物は、本発明の抗体(全長抗体(whole antibody、例えばwhole Ig G等)、組換え抗体(例えばキメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体等)、低分子化抗体(例えばscFv抗体等))の一部が欠損している抗体断片を含み、抗原への結合能を有していれば特に限定されない。本発明の抗体断片は、全長抗体の一部分であれば特に限定されないが、重鎖可変領域(VH)又は／及び軽鎖可変領域(VL)を含んでいることが好ましい。VHまたはVLのアミノ酸配列は、置換、欠失、付加及び／又は挿入がされていてもよい。さらに抗原への結合能を有する限り、VH又は／及びVLの一部を欠損させてもよい。又、可変領域はキメラ化やヒト化されていてもよい。抗体断片の具体例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv等を挙げることができる。このような抗体断片を得るには、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

[0045] また本発明の抗体は、ポリエチレングリコール(PEG)、放射性物質、蛍光物質、発光物質、酵素、トキシン等の各種分子と結合したコンジュゲート抗体でもよい。このようなコンジュゲート抗体は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている(例えば、US5057313、US5156840)。本発明における「抗体」にはこれらのコンジュゲート抗体も包含される。

[0046] 抗体のNR10に対する結合活性の測定は、当業者に公知の方法により行うことが可能である。例えば、抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、酵素免疫測定法を用いる場合、抗原をコーティングしたプレートに、抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベートし、洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。

また、抗体のNR10に対する中和活性の測定は、例えば、実施例記載の、該IL-31依存性細胞株の増殖抑制効果を観察する方法によって行うことができる。

[0047] 本発明のNR10アンタゴニスト又はNR10に対する中和活性を有する抗体は、炎症性疾患の予防または治療剤に用いることが出来る。本発明者らは、マウスNR10に対する中和抗体を各種炎症モデル動物に投与し、顕著な治療効果が得られることを実証した。また、アトピー性皮膚炎患者の肥厚した表皮において、ヒトNR10の発現が亢進しているとの報告があり(非特許文献1)、一方、本発明者らは上記慢性皮膚炎モデルのマウス耳介の免疫組織染色を行ったところ、ヒトと同様に、肥厚した表皮でマウスNR10の発現が亢進していることを確認した(実施例5)。これらのことから、NR10は、炎症性疾患においていずれの動物種においても同様に関与していると考えられ、ヒトNR10に対する中和抗体は、マウスNR10中和抗体と同様に、各種炎症性疾患の予防および治療に有効であると考えられる。さらに、抗体以外のNR10アンタゴニストについても、本実施例における所見と同様に、各種炎症性疾患に対する治療効果を有するものと考えられる。

[0048] 本発明において炎症性疾患とは、物理的、化学的、または生物学的作用物質による損傷や異常刺激によって、罹患した血管および隣接した組織に起こる細胞学的・組織学的反応に関する病理学上の所見を伴う疾患(ステッドマン医学大辞典第5版、株式会社メジカルレビュー社、2005年)を言う。一般的に炎症性疾患は皮膚炎(アトピー性皮膚炎、慢性皮膚炎、等)、炎症性腸疾患(大腸炎、等)、喘息、関節炎(関節リウマチ、変形性関節症、等)、気管支炎、Th-2型自己免疫疾患、全身性エリテマトー

デス、重症筋無力症、慢性GVHD、クローン病、変形性脊椎炎、腰痛、痛風、手術外傷後の炎症、腫脹の緩解、神経痛、咽喉頭炎、膀胱炎、肝炎（非アルコール性脂肪性肝炎、アルコール性肝炎、等）、B型肝炎、C型肝炎、動脈硬化などが挙げられる。

本発明の対象となる炎症性疾患の好ましい例として、アトピー性皮膚炎、慢性皮膚炎、リウマチ、変形性関節症、慢性喘息が挙げられる。

本発明者らは、NR10に対するアンタゴニスト抗体がアトピー性皮膚炎、慢性皮膚炎、リウマチ、変形性関節症に対して治療効果を有していることを見出した。一方、急性接触性皮膚炎およびDSS急性大腸炎モデルにおいては、NR10に対するアンタゴニスト抗体が治療効果を有さないことが判明した。

[0049] 本発明の炎症性疾患の予防または治療剤は、上述のNR10アンタゴニスト又はNR10に対する中和活性を有する抗体を有効成分として含有することを特徴とする。NR10アンタゴニストを「有効成分として含有する」とは、NR10アンタゴニストを活性成分の少なくとも1つとして含むという意味であり、その含有率を制限するものではない。また、本発明の炎症性疾患の予防または治療剤は、NR10アンタゴニストと合わせて他の炎症性疾患の予防または治療を促進する成分を含有してもよい。

[0050] 本発明のNR10アンタゴニストは、常法に従って製剤化することができる（例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A）。さらに、必要に応じ、医薬的に許容される担体及び/または添加物を併に含んでもよい。例えば、界面活性剤（PEG、Tween等）、賦形剤、酸化防止剤（アスコルビン酸等）、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤（リン酸、クエン酸、他の有機酸等）、キレート剤（EDTA等）、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含むことができる。しかしながら、本発明の炎症性疾患の予防または治療剤は、これらに制限されず、その他常用の担体を適宜含んでもよい。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を挙げるこ

とができる。また、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン及び免疫グロブリン等の蛋白質、並びに、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン及びリシン等のアミノ酸を含んでいてもよい。注射用の水溶液とする場合には、NR10アンタゴニストを、例えば、生理食塩水、ブドウ糖またはその他の補助薬を含む等張液に溶解する。補助薬としては、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、さらに、適当な溶解補助剤、例えばアルコール(エタノール等)、ポリアルコール(プロピレングリコール、PEG等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート80、HCO-50)等と併用してもよい。

[0051] また、必要に応じNR10アンタゴニストをマイクロカプセル(ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル)に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム(リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる(Remington's Pharmaceutical Science 16th edition &, Oslo Ed. (1980)等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、NR10アンタゴニストに適用し得る(Langer et al., J.Biomed.Mater.Res.(1981) 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. (1982)12: 98-105;米国特許第3,773,919号;欧州特許出願公開(EP)第58,481号; Sidman et al., Biopolymers(1983)22:547-56; EP第133,988号)。

[0052] 本発明の炎症性疾患の予防または治療剤は、経口または非経口のいずれでも投与可能であるが、好ましくは非経口投与される。具体的には、注射及び経皮投与により患者に投与される。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射または皮下注射等により全身又は局所的に投与することができる。炎症を抑制したい部位またはその周辺に局所注入、特に筋肉内注射してもよい。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、1回につき体重1kgあたり活性成分が0.0001mg～100mgの範囲で選ぶことが可能である。または、例えば、ヒト患者に投与する場合、患者あたり活性成分が0.001～1000mg/kg・body・weightの範囲を選ぶことができ、1回当たり投与量としては、例えば、NR10アンタゴニストが0.01～50mg/kg・body・weight程度の量が含まれることが好ましい。しかしながら、本発明の炎症性疾患の予防または治療剤は、これらの投与量に制限されるもので

はない。

[0053] また本発明は、NR10に対する中和活性を有する抗体(NR10に対する中和活性を有する抗体の断片及び／又はその修飾物を含む。以下同様)を提供する。本発明のNR10に対する中和活性を有する抗体は、上記炎症疾患の予防または治療剤において有効成分として有用である。本発明のNR10に対する中和活性を有する抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよいが、好ましくはモノクローナル抗体である。NR10に対する中和活性を有するモノクローナル抗体は、上述の方法によって得ることが可能である。また、本発明のモノクローナル抗体は、哺乳動物由来のNR10またはその断片に対して中和活性を有し、好ましくはヒトやマウス由来のNR10またはその断片に対して中和活性を有し、さらに好ましくはヒト由来のNR10またはその断片に対して中和活性を有する。ヒトNR10に対する中和活性を有するモノクローナル抗体を作成するためには、免疫原としてヒトのNR10またはその断片ペプチドを用いればよい。また、本発明のNR10に対する中和活性を有する抗体は、組換え抗体であってもよい。本発明のNR10に対する中和活性を有する組換え抗体としては、これに限定されるものではないが、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、低分子化抗体が挙げられる。

[0054] 本発明において、NR10に対する中和活性を有する抗体の例としては、配列番号:1に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、配列番号:3に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を有する抗マウスNR10抗体を挙げることができる。

[0055] 本発明には、ヒトNR10に対する中和活性を有するモノクローナル抗体も含まれる。本発明のヒトNR10に対する中和活性を有するモノクローナル抗体は、上述のように、免疫原としてヒトのNR10またはその断片ペプチドを用いることによってモノクローナル抗体を作製し、さらにそれら抗ヒトNR10モノクローナル抗体の中から、上記IL-31依存性細胞株を用いたアッセイ系によって、ヒトNR10中和活性を有する抗体を選抜することが可能である。

本発明において、ヒトNR10に対する中和活性を有する抗体の例としては、以下の(a)から(d)いずれかに記載の抗体を挙げることができる。

(a) CDR1として配列番号:18に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:19に記

載のアミノ酸配列、CDR3として配列番号:20に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を有する抗体。

(b) CDR1として配列番号:21に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:22に記載のアミノ酸配列、CDR3として配列番号:23に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体。

(c) (a)の重鎖可変領域と(b)の軽鎖可変領域を有する抗体。

(d) (a)～(c)いずれかに記載の抗体と同じエピトープを認識する抗体。

ある抗体が他の抗体と同じエピトープを認識するか否かは、両者のエピトープに対する競合によって確認することができる。抗体間の競合は、競合結合アッセイによって評価することができ、その手段としてELISA、蛍光エネルギー転移測定法(FRET)や蛍光微量測定技術(FMAT(登録商標))などが挙げられる。抗原に結合した該抗体の量は、同じエピトープへの結合に対して競合する候補競合抗体(被検抗体)の結合能に間接的に相関している。すなわち、同じエピトープに対する被検抗体の量や親和性が大きくなるほど、該抗体の抗原への結合量は低下し、抗原への被検抗体の結合量は増加する。具体的には、抗原に対し、適当な標識をした該抗体と評価すべき抗体を同時に添加し、標識を利用して結合している該抗体を検出する。抗原に結合した該抗体量は、該抗体を予め標識しておくことで、容易に測定できる。この標識は特には制限されないが、手法に応じた標識方法を選択する。標識方法は、具体的に蛍光標識、放射標識、酵素標識などが挙げられる。

例えば、NR10を発現させた動物細胞に蛍光標識した該抗体と、非標識の該抗体あるいは被検抗体を同時に添加し、標識された該抗体を蛍光微量測定技術によって検出する。

ここでいう同じエピトープを認識する抗体とは、標識該抗体に対して、非標識の該抗体の結合により結合量を50%低下させる濃度(IC_{50})に対して、被検抗体が非標識該抗体の IC_{50} の10倍高い濃度で少なくとも50%、標識該抗体の結合量を低下させることができる抗体である。

本発明で用いられるヒトNR10に対して中和活性を有する抗体はさらにカニクイザルNR10に対して結合活性を有することが好ましく、カニクイザルNR10に対して中和活

性を有することがさらに好ましい。カニクイザルNR10への結合活性または中和活性の測定には、配列番号:24に記載のアミノ酸配列からなるカニクイザルNR10を用いることが可能である。

[0056] なお、本発明は、以下に示す治療方法もまた提供する。ここで、NR10、アンタゴニスト、モノクローナル抗体、組換え抗体、炎症性疾患等の説明は上述の通りである。

- (1) NR10アンタゴニストを炎症性疾患を呈する患者に投与する工程を含む、炎症性疾患を予防または治療する方法
- (2) NR10アンタゴニストがNR10への結合活性を有する抗体である、(1)に記載の方法
- (3) 抗体がモノクローナル抗体である、(2)に記載の方法
- (4) 抗体がヒトNR10に結合するモノクローナル抗体である、(2)に記載の方法
- (5) 抗体が組換え抗体である、(2)～(4)のいずれかに記載の方法
- (6) 組換え抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、(5)に記載の方法
- (7) NR10に対する中和活性を有する抗体の断片及び／又はその修飾物を有効成分として含有する、(2)～(6)のいずれかに記載の方法
- (8) 炎症性疾患がアトピー性皮膚炎である(1)～(7)のいずれかに記載の方法
- (9) 炎症性疾患が慢性皮膚炎である(1)～(7)のいずれかに記載の方法
- (10) 炎症性疾患がリウマチである(1)～(7)のいずれかに記載の方法
- (11) 炎症性疾患が変形性関節症である(1)～(7)のいずれかに記載の方法

[0057] さらに本発明は、以下に示す発明もまた提供する。ここで、NR10、アンタゴニスト、モノクローナル抗体、組換え抗体、炎症性疾患等の説明は上述の通りである。

- (1) 炎症性疾患の予防または治療のために用いる剤の製造における、NR10アンタゴニストの使用
- (2) NR10アンタゴニストがNR10への結合活性を有する抗体である、(1)に記載の使用
- (3) 抗体がモノクローナル抗体である、(2)に記載の使用
- (4) 抗体がヒトNR10に結合するモノクローナル抗体である、(2)に記載の使用
- (5) 抗体が組換え抗体である、(2)～(4)のいずれかに記載の使用

- (6)組換え抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、(5)に記載の使用
- (7)NR10に対する中和活性を有する抗体の断片及び／又はその修飾物を有効成分として含有する、(2)～(6)のいずれかに記載の使用
- (8)炎症性疾患がアトピー性皮膚炎である(1)～(7)のいずれかに記載の使用
- (9)炎症性疾患が慢性皮膚炎である(1)～(7)のいずれかに記載の使用
- (10)炎症性疾患がリウマチである(1)～(7)のいずれかに記載の使用
- (11)炎症性疾患が変形性関節症である(1)～(7)のいずれかに記載の使用

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

- [0058] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

〔実施例1〕NR10およびOSMR発現Ba/F3細胞株の樹立

ヒトNR10 cDNA(WO 0075314 SEQ ID No:1)を発現ベクターpCOS1(Biochem Biophys Res Commun. 228, p838-45, 1996)に組み込み、pCosNR10.3とした。オンコスタチンM受容体 cDNA(OSMR, GenBank accession No. NM003999)をヒト胎盤ライブラリーからPCR法により単離し、同様に、発現ベクターpCos1-hOSMRを構築した。マウスIL-3依存性pro-B細胞由来細胞株Ba/F3に、それぞれのベクター10 μ gずつを同時にエレクトロポレーション法で導入した(BioRad Gene Pulser, 960 μ F, 0.33 kV)。導入後は、ヒトIL-31を添加・培養し、IL-31依存性に増殖を示す細胞株を得た。同様に、マウスIL-31依存性細胞株も、マウスNR10およびマウスOSMR遺伝子を発現させたBa/F3細胞から作製した。

- [0059] いずれも数ng/mLのED50を示し、良好に増殖する細胞株が得られた。ヒトIL-31依存性細胞株はマウスIL-31に反応せず、ヒトNR10蛋白(細胞外領域)添加により抑制された。マウスIL-31依存性細胞株は、ヒトIL-31に反応せず、マウスNR10添加蛋白(細胞外領域)により抑制されなかった。

- [0060] 〔実施例2〕NR10蛋白(細胞外領域)の調製

ヒトNR10 cDNAを鋳型に、PCR法により細胞外領域のみを増幅し、またC末端にFL

AGタグ配列を付加し、発現ベクターpCXND3 (WO2005/005636) に組み込んだ (pCXND3-NR10-flag)。直鎖状にしたこのベクター10 μ gをチャイニーズハムスター卵巢細胞株DG44へエレクトロポレーション法によって導入し (BioRad Gene PulserII, 25 μ F, 1.5 kV)、高発現を示す細胞株を得た。この細胞株を大量培養した培養上清から抗FLAG抗体カラム (SIGMA製)、ゲル濾過法により精製標品を得、以下の実験に供した。C末端にFLAGタグ配列を付加したマウスNR10 (細胞外領域) も同様に調製した。

[0061] [実施例3] 抗マウスNR10中和活性を有するscFvの単離とキメラIgG化BM095の調製
具体的には、本発明者らは、ヒト抗体ファージライブラリーから、ビオチン化したマウスNR10蛋白 (細胞外領域) を用いて、パニング法により候補クローンの絞り込みを行った。これらのクローンから分泌scFvを精製し、これを実施例1に記載のIL-31依存性Ba/F3細胞増殖アッセイ系に添加した。その結果、強い増殖抑制活性を示すクローンBM095を得ることに成功した。

[0062] PCR法により、BM095のヒトH鎖可変領域配列 (VH) をマウスIgG2a定常領域 (CH1以降) に、ヒトL鎖可変領域配列 (VL) をマウス κ 鎖定常領域に連結し、発現ベクターを構築した。この時のVHのアミノ酸配列を配列番号:1に、該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号:2に示す。また、VLのアミノ酸配列を配列番号:3に、該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号:4に示す。直鎖状にした各々の発現ベクターを同時にDG44株に導入し、キメラIgGの高い発現量を示す細胞株を選別した。この細胞株を大量培養した培養上清から、プロテインA (rProtein A Sepharose Fast Flow, GE Amersham Biosciences製) カラム、陽イオン交換 (SP-TOYOPEARL 650M, TOSOH製) カラムクロマトグラフィーにより、精製標品を得た。さらに、ActiClean Etox (Sterogen製) 樹脂によりパイロジェンを検出限界以下まで低減し、以下の動物実験に供した。また、上記アッセイ系にBM095を添加したときの結果を、図1に示す。

[0063] [実施例4] NC/Ngaマウスを用いたアトピー性皮膚炎モデルでの薬効検討
皮膚炎モデルは、塩化ピクリル (PiCl) 塗布を週一回繰返すことにより作製した。すなわち、5% PiCl (150 μ L) 腹部・足蹠への感作4日後から、0.8% PiCl (150 μ L) 背部・耳介への週一回誘発を繰返した。3週目から6週にかけて、週2回症状を観察し、5つの視点 ((1) 掻痒症、(2) 発赤・出血、(3) 浮腫、(4) 損傷・組織欠損、(5) 痂皮形成・乾

燥)から各0～3点のスコアリングを実施した。抗体は、感作・各誘発前日の6回(BM095群)、もしくは3週目以降の各誘発前日の3回(V/B群)、10 mg/kgで腹腔内投与した。陽性対照として、3週目以降毎日1 mg/kgデキサメサゾンを経口投与した(DEX群)。それぞれ一群10匹のNC/Ngaマウス♂を使用した。

[0064] 図2に示すように、溶媒投与vehicle群に比し、抗体投与群では、有意な抑制効果が認められた。またこの時、図2に示すように、DEX群では有意な体重減少が認められたが、抗体投与群では変化は無く、非常に安全な薬剤であることが示唆された。

[0065] [実施例5]塩化ピクリル繰返し塗布による慢性皮膚炎モデルでの薬効検討

6週令の雌性BALB/cマウスに、20 μ Lの0.5%塩化ピクリル(acetone/olive oil (1:4 v/v)溶液)を右耳に塗布して感作を行った。感作後8日目より1日おきに右耳に20 μ Lの0.25%塩化ピクリル(acetone/olive oil (1:4 v/v))を塗布することにより誘発を繰り返した。BM095の予防効果評価群には感作前日より、BM095治療効果評価群には誘発開始後20日目より、週1回、10 mg/kgのBM095を腹腔内投与した。Dial thickness gaugeにより右耳の厚さを経時的に測定することにより、耳介腫脹を評価した。

[0066] その結果、図4に示すように、抗体投与群では有意な抑制効果が認められた。アトピー性皮膚炎患者の肥厚した表皮ではヒトNR10の発現が亢進していることが報告されている(非特許文献1)。上記慢性皮膚炎モデルのマウス耳介の免疫組織染色を行ったところ、ヒトと同様に、肥厚した表皮でマウスNR10の発現亢進が観察された(図5。実施例3に於いて定常領域をヒトIgGに変換したBM095を作製し、免疫組織染色に用いた。茶褐色に発色している部分がNR10発現部位)。本所見は、ヒトおよびマウスにおいて、炎症性疾患に対しNR10が同様に関与していることを示唆する。

[0067] [実施例6]コラーゲン誘発関節炎(リウマチ)モデルでの薬効検討

モデルマウスの作製、および薬効評価は以下のように行った。

9週齢の雌DBA/1JNマウスに対し、ウシ関節由来0.3%II型コラーゲンとComplete Adjuvant H37Raを等量混合したコラーゲングル140 μ Lを尾根部皮内に投与した(Day0、感作)。3週間後に同様に調製したコラーゲングルを背部皮内に投与し、関節炎の発症を誘発した(Day21、誘発)。感作前々日(Day-2)の体重をもとにマウス16匹を各8匹の2群に分け、溶媒投与群とBM095投与群を設定した。被験物質であるBM095は

、PBSで6倍希釈した20 mmol/L Acetate buffer (pH5.5) (200 mmol/L NaCl)を溶媒として、BM095投与群の8匹のマウスに対して10 mg/kg体重となるように感作前日 (Day -1)に静脈内投与した。一方、対照の溶媒投与群とした8匹のマウスに対しては、体重あたり同一容量となるように溶媒をDay-1に投与した。なお、誘発前日 (Day20)より2-3日の間隔で四肢の腫脹を観察し、スコアリング (1肢あたり0-4点:16点満点)により評価を行った。

[0068] その結果、図6に示すように、BM095投与群ではDay20以降の四肢の腫脹においてスコアの低下がみられ、BM095は関節炎発症抑制作用を有することが示された。

[0069] [実施例7]コラゲナーゼ誘発関節炎 (変形性関節症) モデルでの薬効検討
モデルマウスの作製、および薬効評価は以下のように行った。

8週齢の雄C57BL/6J Jclマウス (日本クレア製) に対し、溶媒対照 (PBSで6倍希釈した20 mmol/L Acetate buffer, pH5.5, 200 mmol/L NaCl, n=5)、BM095 2mg/kg (n=5)、BM095 20 mg/kg (n=6) を尾静脈より静脈内投与した (5mL/kg)。その後3%イソフルラン吸入麻酔下で、0.45 μ mフィルター (MILLIPORE社製) で濾過した1.5% コラゲナーゼ溶液 (TypeII, Sigma社製) 6 μ Lを右膝関節腔内に投与した (Am J Pathol 1989; 135(6):1001-14)。

[0070] 左右の膝関節幅について、ノギス (ミツトヨ製) を用いてコラゲナーゼ投与直前、投与後3,7,14日に測定し、左右の差を算出した。この差を右膝関節の腫脹を表す値とし、その推移の曲線下面積 (AUC) を台形法で算出し、薬効の指標とした。AUCについて、溶媒対照群とCNP投与群の間で統計解析ソフトウェア (SAS Institute社製) を用いてStudent t検定を行った ($p < 0.05$ の場合有意差あり)。その結果、図7に示すように、BM095投与群のAUCは、いずれの用量においても溶媒対照群に対し有意に小さかった。この結果から、BM095が変形性関節症モデルにおける関節炎を抑制することが明らかになった。

[0071] [実施例8]抗ヒトNR10中和抗体の取得

ヒトNR10蛋白 (細胞外領域) [実施例2に記載] をマウスに免疫し、通常の方法によりハイブリドーマを作製した。これらのハイブリドーマの培養上清を、実施例1で示したヒトHL-31依存性細胞株 (hNR10/hOSMR/BaF3細胞) を用いた中和活性で評価し、高

いNR10中和活性を有するいくつかのクローンを得た(図8)。

[0072] [実施例9]ヒト・キメラ抗体の作成

中和抗体の中で最も活性の高かった、NA633の重鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号:16に、軽鎖鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号:17に示す。又、NA633の重鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列を配列番号:18に、CDR2のアミノ酸配列を配列番号:19に、CDR3のアミノ酸配列を配列番号:20に、軽鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列を配列番号:21に、CDR2のアミノ酸配列を配列番号:22に、CDR3のアミノ酸配列を配列番号:23に示す。

さらに、常法にしたがい、これらマウス可変領域と、ヒト定常領域(H鎖はIgG1, L鎖は κ)とのキメラ抗体を作製し、中和活性を測定した。図9に示すように、キメラNA633抗体は低濃度で強い中和活性を示した。

[0073] [実施例10]カニクイザルNR10の単離

前臨床段階での安全性評価のため、カニクイザルへの交差性・中和活性は重要であると考え、カニクイザルNR10遺伝子の単離を試みた。公開されているアカゲザルゲノム情報などからプライマーを設計し、PCR法によりカニクイザル臓器からNR10遺伝子の増幅に成功した。単離したカニクイザルNR10とヒトNR10のアミノ酸配列のアライメントを図10に示す。又、カニクイザルNR10のアミノ酸配列を配列番号:24に示す。このカニクイザルNR10遺伝子を用いて、実施例1で述べたように、ヒトOSMR遺伝子と共にBa/F3細胞に導入し、ヒトIL-31依存性増殖を示す細胞株を樹立した。この細胞株を用いて実施例9のキメラ抗体NA633の中和活性を調べたところ、カニクイザルでも強い中和活性を示すことが判明した(図11)。

[0074] [参考例1]Dextran Sulfate Sodium (DSS) 誘発大腸炎に対するBM095の薬効

炎症性腸疾患 (IBD)の病態モデルとして報告されているDSS誘発大腸炎モデル(J Immunol 2003;171:5507-5513)を作製し、抗マウスNR10中和抗体であるBM-095の効果を検討した。Dextran Sulfate Sodium Salt (和光純薬製)の5% (w/v) 水溶液を、0.22 μ mフィルター(Millipore製)で濾過滅菌した蒸留水を用いて調製し、6週齢のオスBalb/cAnN Crjマウス(日本チャールス・リバー製)に給水ビンにて7日間自由摂取させ、体重を測定し、DSS投与開始日の体重に対する変化率を薬効の評価項目とした。

本モデルにおいて、IL-31シグナリング中和により病態が改善されるかどうかを、抗マウスNR10中和抗体であるBM095をDSS投与前日に10 mg/kgの用量で静脈内投与して体重減少を評価した(n=10)。溶媒対照群として、溶媒(酢酸緩衝液[20 mmol/L 酢酸ナトリウム、20 mmol/L 塩化ナトリウム]と磷酸緩衝生理食塩水[PBS, GIBCO製]を容量比1:5で混合したもの)を、DSS投与前日に静脈内投与した群(Vehicle群, n=10)を設けた。また、正常マウスの体重変化率の推移を把握するため、DSS投与群と同じ週齢、性別のBalb/cAnN Crjマウスの体重変化率の推移も観察した(n=1)。

体重の推移を図12に示した。Vehicle群においてはDSS投与により体重変化率が低下した。一方、BM095投与群においてもVehicle群と同様の体重推移を示したが、DSS投与後4および5日後ではBM095群ではVehicle群よりも有意に体重変化率が低下した。これら結果から、BM095投与による本モデルの大腸炎治療効果は認められなかった。

本モデルにおいては、IL-31RAの発現が亢進することが報告されているが(WO2004/003140)、上記実験の結果、同分子の中和抗体は本モデルの大腸炎に対して治療効果がないことが明らかになった。

[0075] [参考例2]急性Picryl chrolide 接触性皮膚炎モデルに対するBM095の薬効

急性接触性皮膚炎のモデルとして報告されている(Clin Immunol 2003; 108: 257-262)、塩化ピクリル塗布による感作・誘発による遅延型過敏症反応の結果生じる皮膚炎を作製し、抗マウスNR10中和抗体であるBM-095の効果を検討した。8週齢のメスBalb/cAnN Crjマウス(日本チャールス・リバー製)の腹部皮膚に、50 μ Lの7%塩化ピクリル(nacalai tesque, Inc.)溶液(エタノール:アセトン=3:1, v/v)を塗布して感作し、5日後に20 μ Lの1% 塩化ピクリル溶液(アセトン:オリーブ=1:4, v/v)を右の耳介皮膚に塗布して接触性皮膚炎を惹起した(誘発)。溶媒の耳介の厚さへの影響を評価するための対照として、20 μ Lの溶媒(アセトン:オリーブ=1:4, v/v)を同一マウスの左の耳介皮膚に塗布した(陽性対照群, n=6)。誘発直前および誘発後24, 48, 72時間に左右の耳の厚さをDial thickness gauge(尾崎製作所製)で測定し、誘発直前の耳介の厚さに対する変化を薬効評価項目とした。

病態の成立を評価するための対照群として、感作時に塩化ピクリルを含まないエタ

ノール:アセトン混合液(3:1, v/v)を腹部皮膚に塗布し、その5日後に20 μ Lの1% 塩化ピクリル溶液を右の耳介皮膚に、溶媒(アセトン:オリーブ=1:4, v/v) 20 μ Lを左の耳介皮膚に塗布した群(陰性対照群, n=6)を設けた。

本系病態における抗NR10抗体投与の効果を評価するために、上記陽性対照群の方法で急性接触性皮膚炎を惹起し、感作前日および誘発前日にBM095 10 mg/kgを静脈内投与した群(BM095群, n=6)と、同じタイミングで溶媒(酢酸緩衝液 [20 mmol/L 酢酸ナトリウム、20 mmol/L 塩化ナトリウム]と隣酸緩衝生理食塩水[PBS, GIBCO製]を容量比1:5で混合したもの)を投与した群(Vehicle群、n=5)を設けた。

誘発後72時間までの耳介の厚さの変化を図13に示した。陽性対照群は誘発後24、48、72時間のいずれにおいても陰性対照群に対して有意に耳介が肥厚しており、病態が成立したことが示された。このとき、BM-095群はVehicle群と同様の耳介の厚さの推移を示し、有意な抑制は認められなかった。

これら結果より、BM095投与による本モデルで観察される急性接触性皮膚炎に対する治療効果は認められないことが判明した。

産業上の利用可能性

- [0076] 本発明によって、新たな炎症性疾患の予防または治療剤が提供された。本発明によって提供された炎症性疾患の予防または治療剤は、その活性成分として、NR10アンタゴニスト、より好ましくはNR10に対する中和活性を有する抗体を含有する。
- [0077] 近年、モノクローナル抗体による抗サイトカイン療法が注目されている。しかしながら、実際の病態においては多くの場合、ひとつのサイトカインを遮断してもその代償経路が働き、治療効果を得ることは困難な状況であった。又、ターゲットとするサイトカインを遮断した場合、どのような疾患で治療効果が得られるのかを予測することは困難であった。このような中、本発明者らは、抗NR10中和抗体がアトピー性皮膚炎、慢性皮膚炎、リウマチ、変形性関節症等を発症したモデルマウスにおいて、その症状を顕著に抑制することが出来ることを見出した。
- [0078] また本発明者らは、ヒトNR10中和抗体の取得にも成功した。ヒトNR10中和抗体を有効成分として含有する炎症性疾患の予防または治療剤は、ヒトへの臨床応用に向けて、極めて有用である。

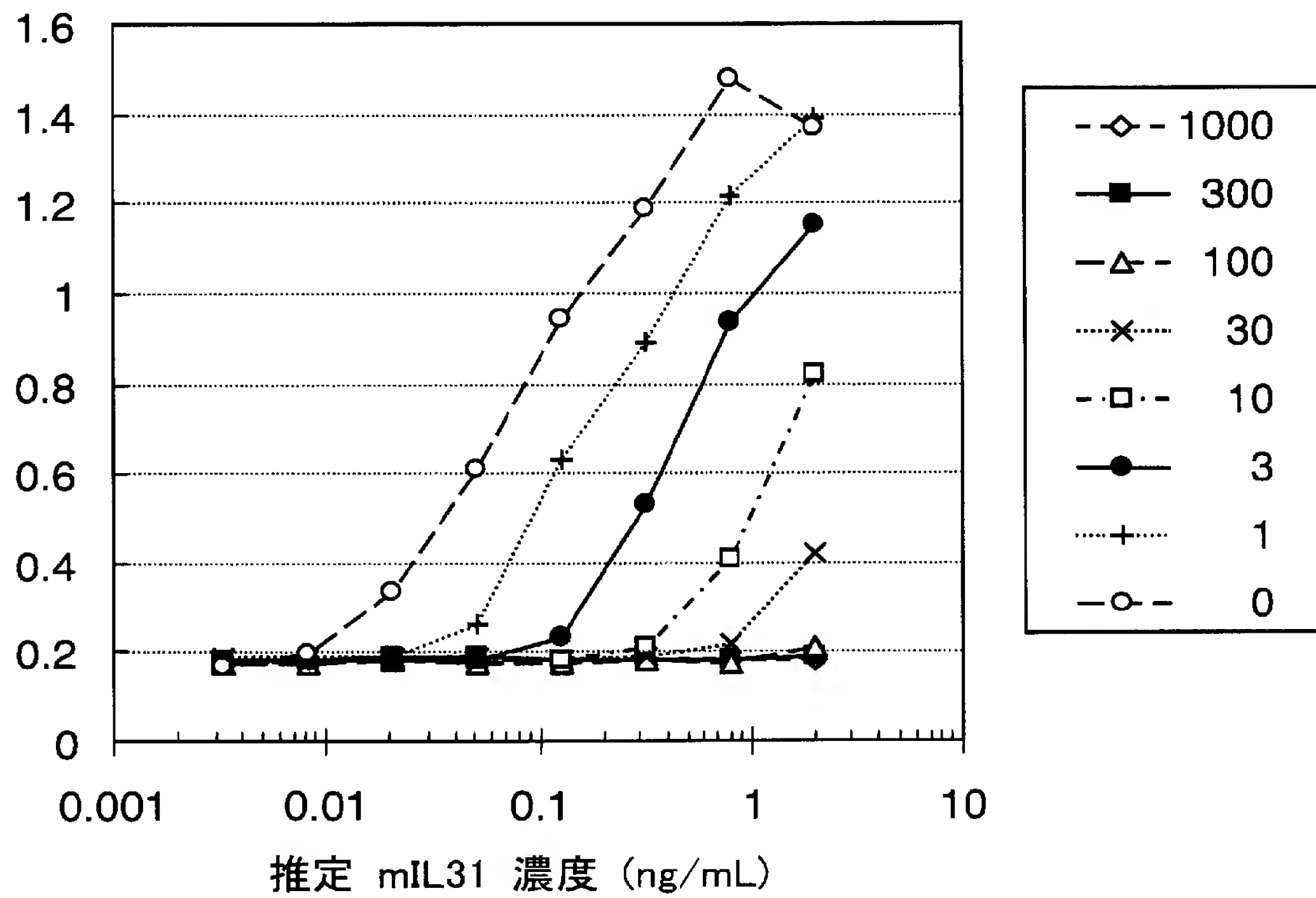
請求の範囲

- [1] NR10アンタゴニストを有効成分として含有する、炎症性疾患の予防または治療剤。
- [2] NR10アンタゴニストがNR10に対する中和活性を有する抗体である、請求項1に記載の予防または治療剤。
- [3] 抗体がモノクローナル抗体である、請求項2に記載の予防または治療剤。
- [4] 抗体がヒトNR10に対する中和活性を有するモノクローナル抗体である、請求項2に記載の予防または治療剤。
- [5] 抗体が組換え抗体である、請求項2～4のいずれかに記載の予防または治療剤。
- [6] 組換え抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項5に記載の予防または治療剤。
- [7] NR10に対する中和活性を有する抗体の断片及び／又はその修飾物を有効成分として含有する、請求項2～6のいずれか1項に記載の予防または治療剤。
- [8] 炎症性疾患がアトピー性皮膚炎である請求項1～7のいずれか1項に記載の予防または治療剤。
- [9] 炎症性疾患が慢性皮膚炎である請求項1～7のいずれか1項に記載の予防または治療剤。
- [10] 炎症性疾患がリウマチである請求項1～7のいずれか1項に記載の予防または治療剤。
- [11] 炎症性疾患が変形性関節症である請求項1～7のいずれか1項に記載の予防または治療剤。
- [12] NR10に対する中和活性を有する抗体。
- [13] モノクローナル抗体である、請求項12に記載の抗体。
- [14] NR10がヒトNR10である請求項12に記載の抗体。
- [15] 組換え型抗体である、請求項12～14のいずれか1項に記載の抗体。
- [16] 組換え型抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項15に記載の抗体。
- [17] 請求項12～16のいずれか1項に記載の抗体の断片及び／又はその修飾物。
- [18] NR10アンタゴニストを炎症性疾患を呈する患者に投与する工程を含む、炎症性疾患

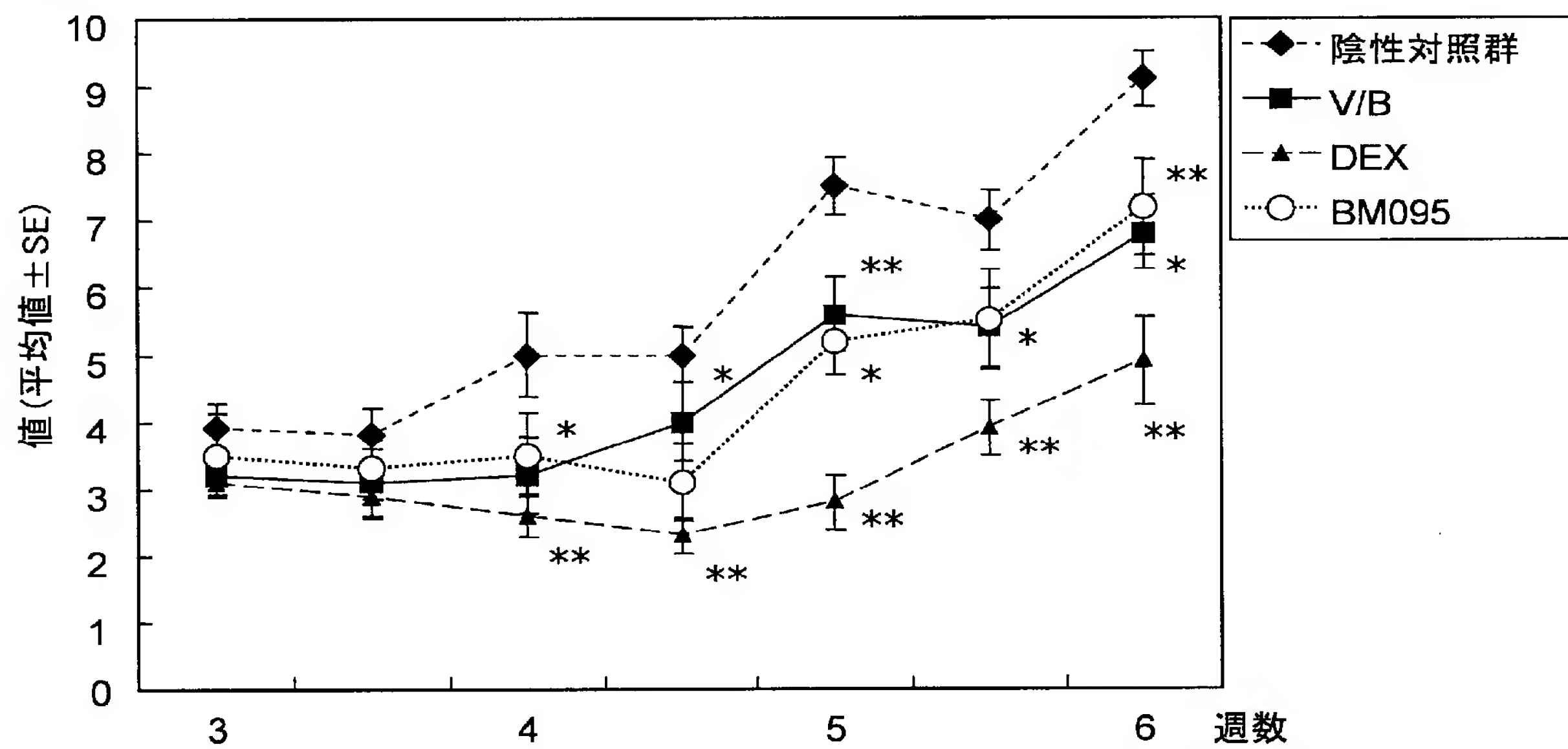
を予防または治療する方法。

- [19] 炎症性疾患の予防または治療のために用いる剤の製造における、NR10アンタゴニストの使用。

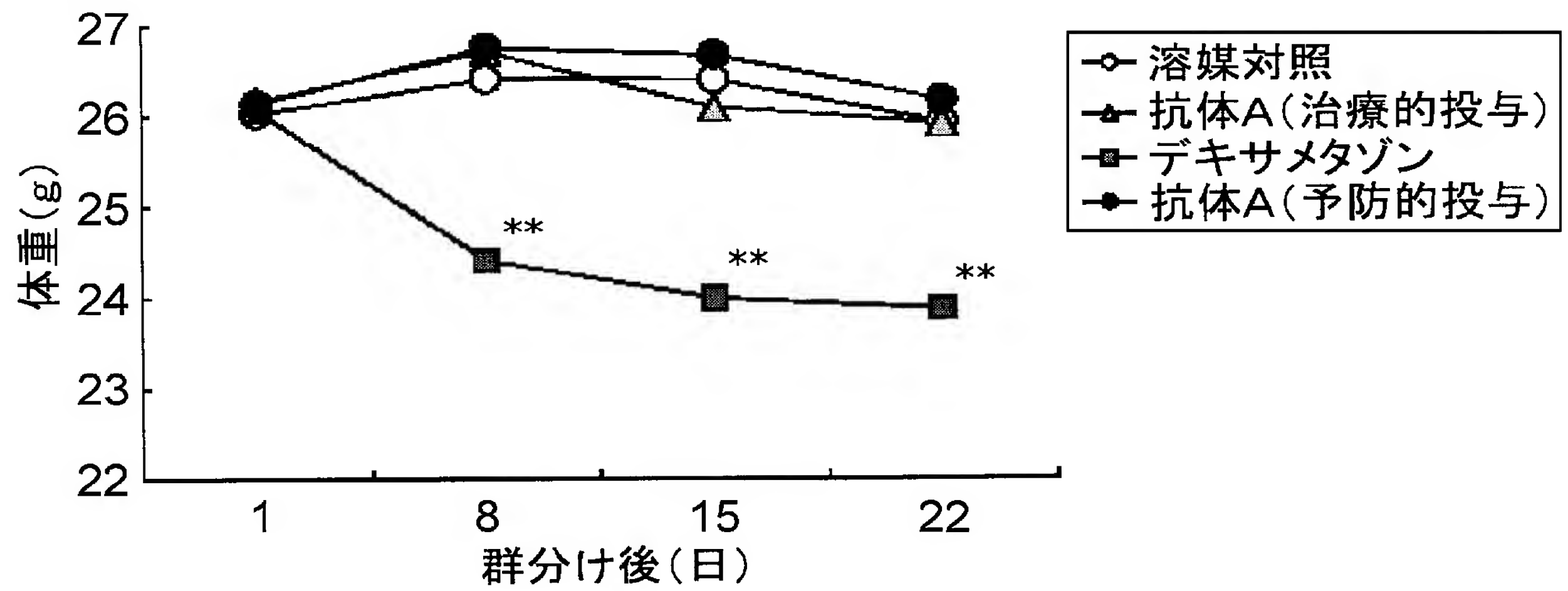
[図1]



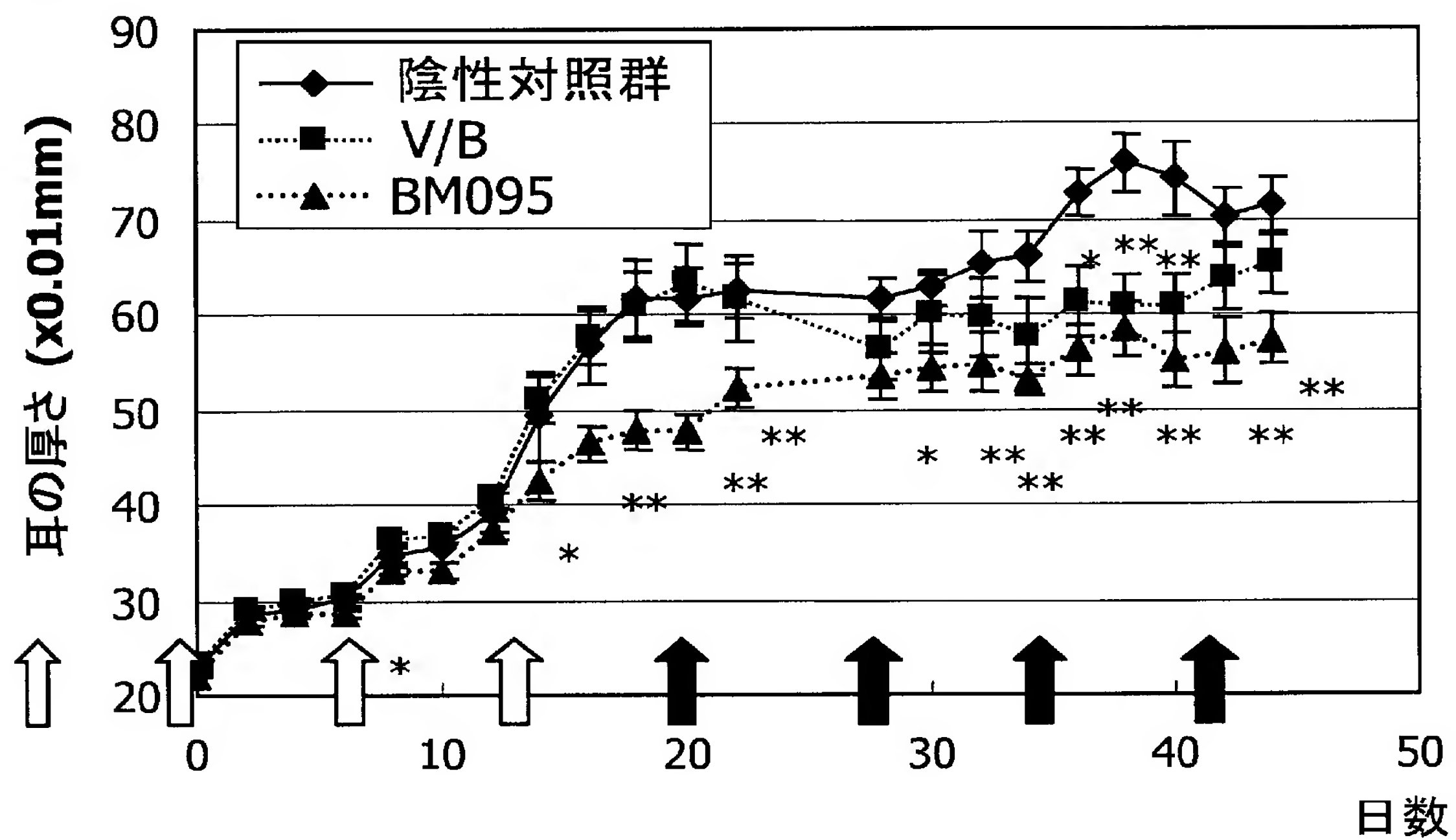
[図2]



[図3]



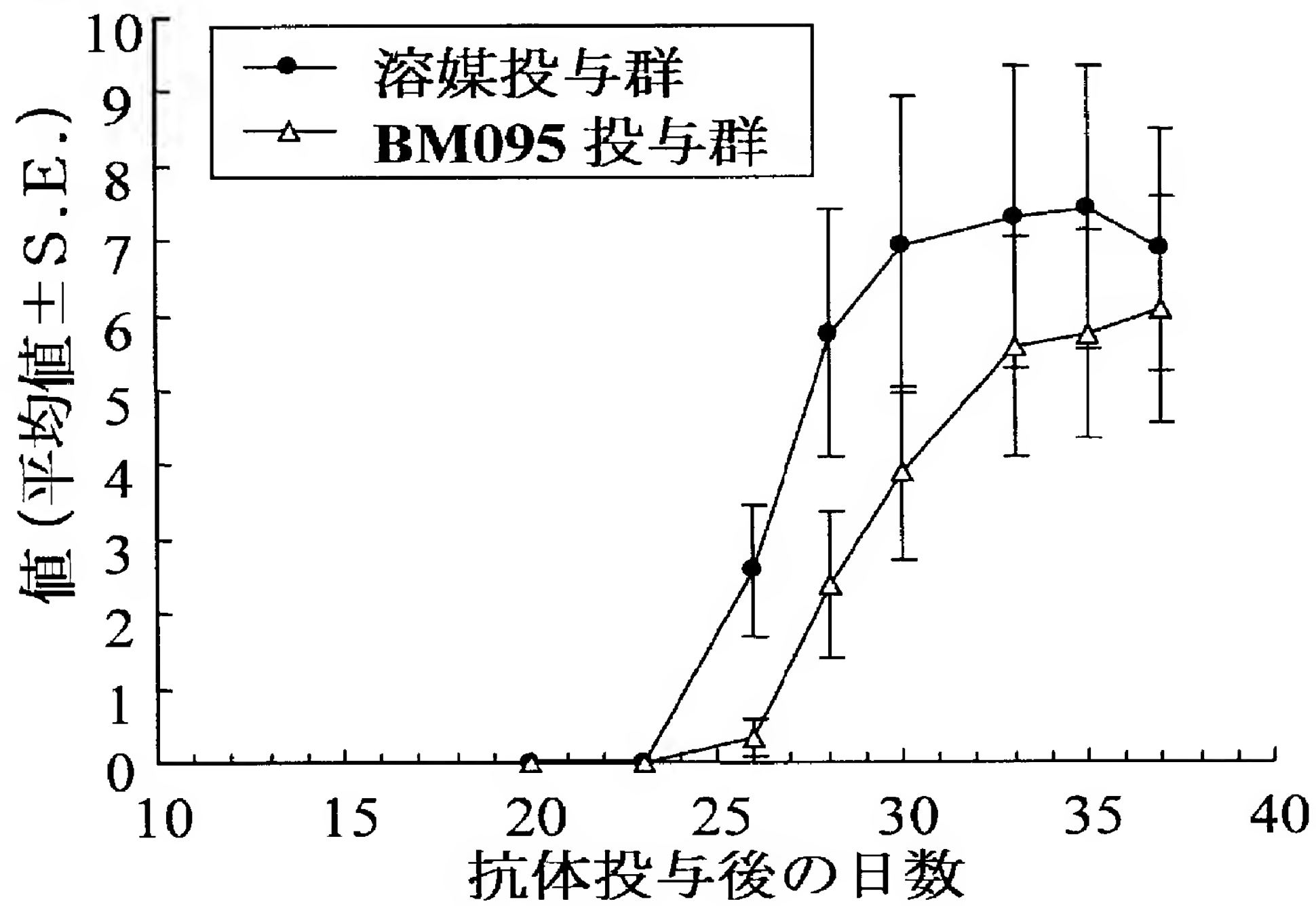
[図4]



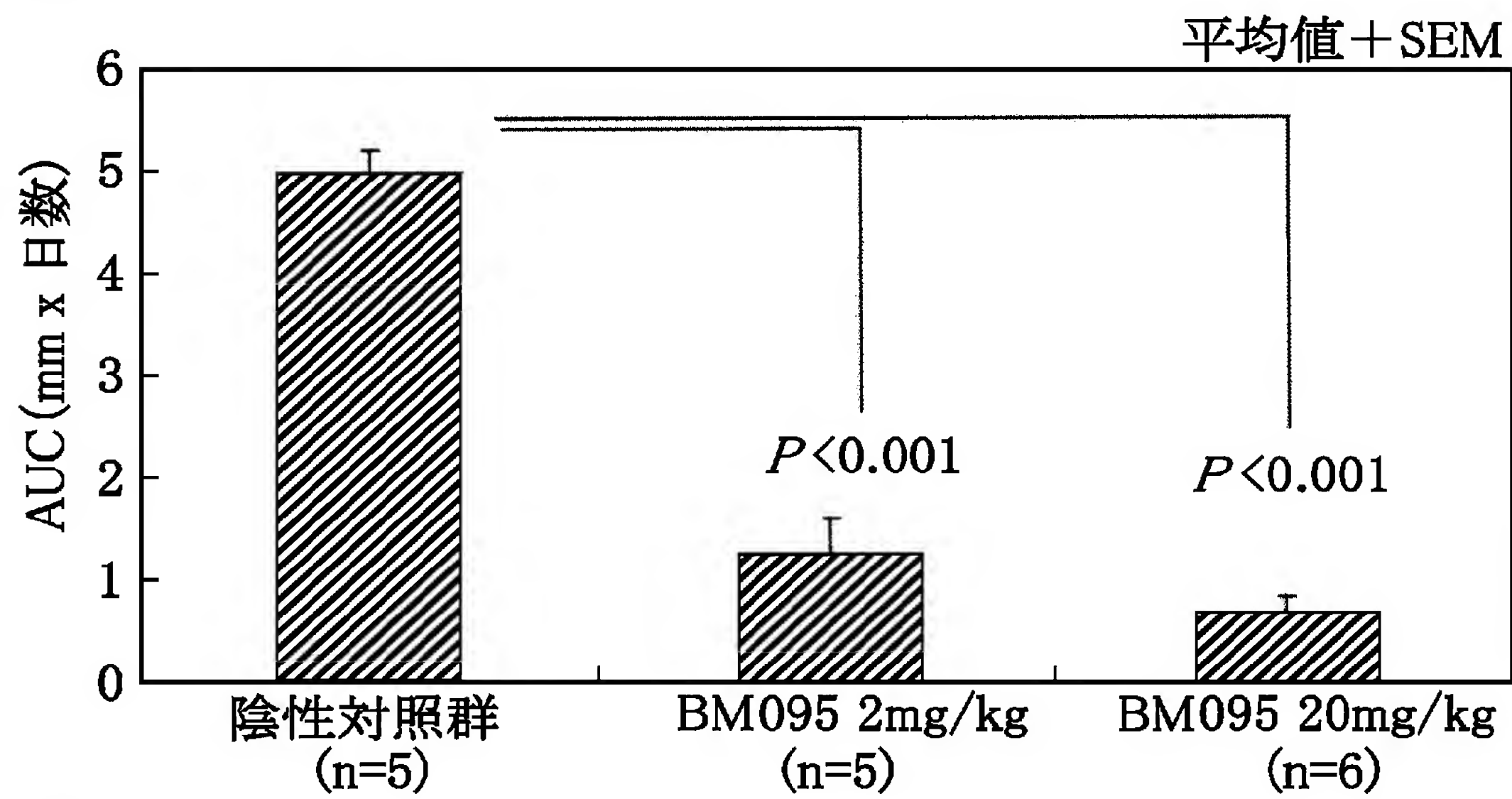
[図5]



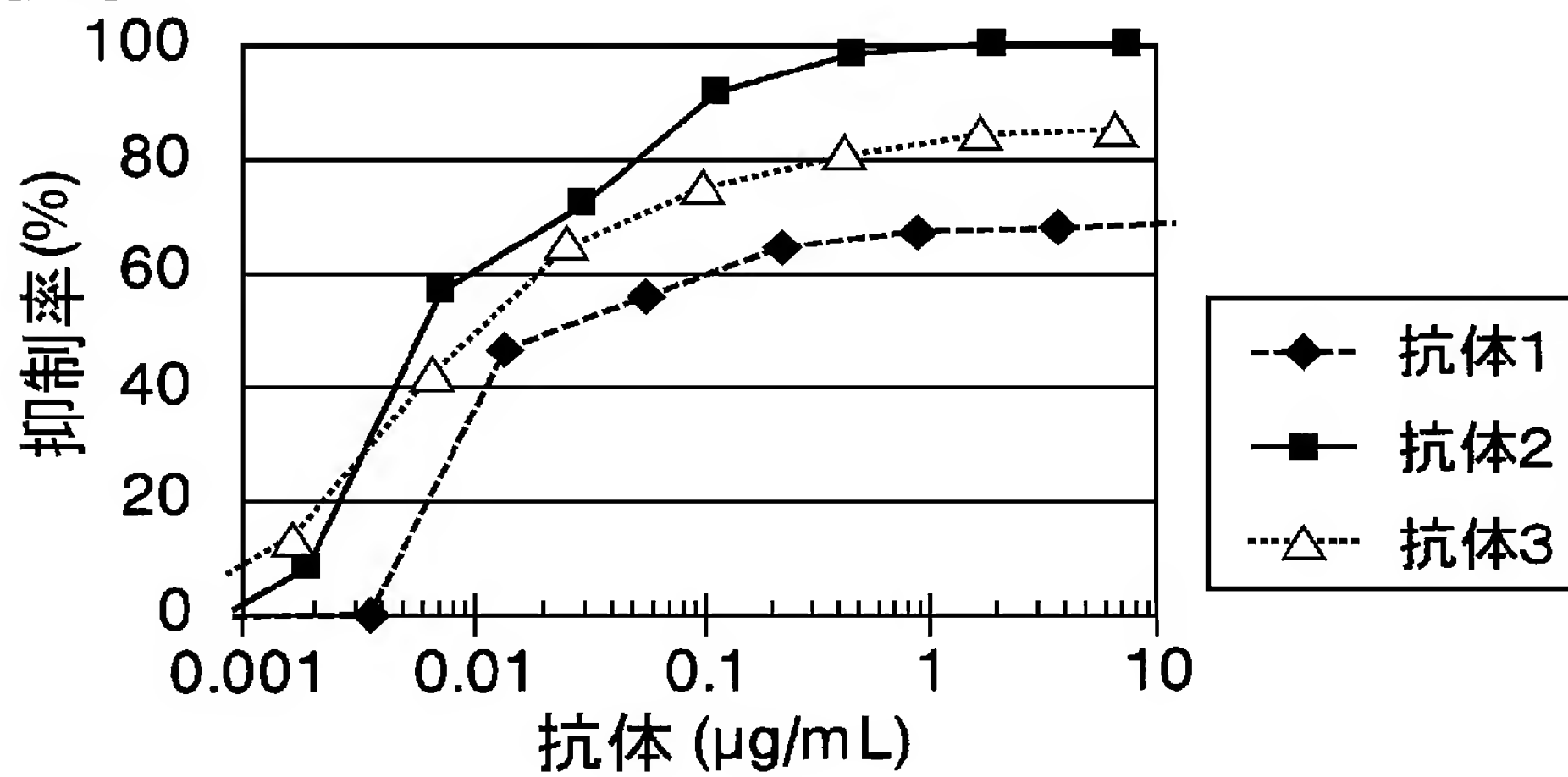
[図6]



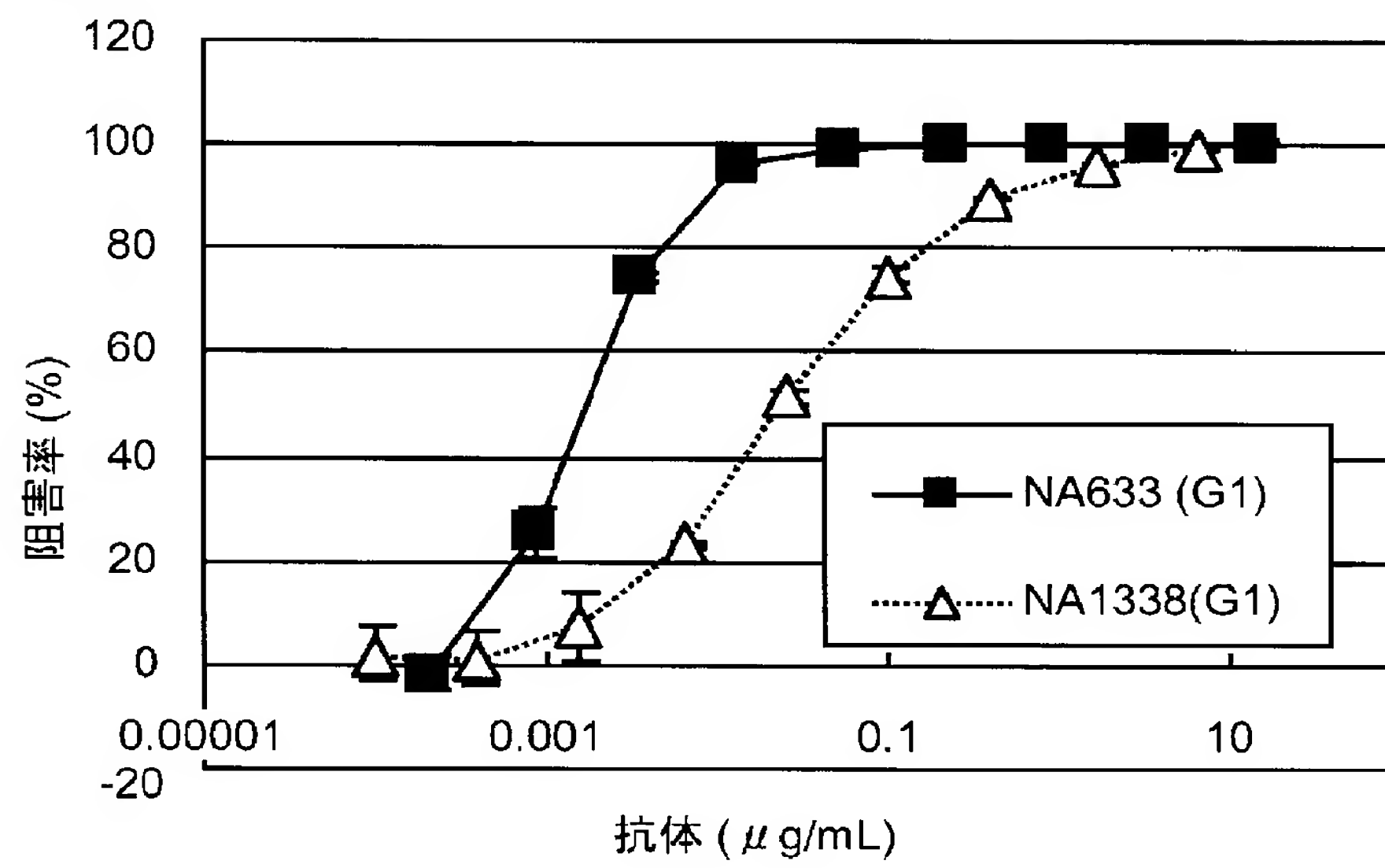
[図7]



[図8]



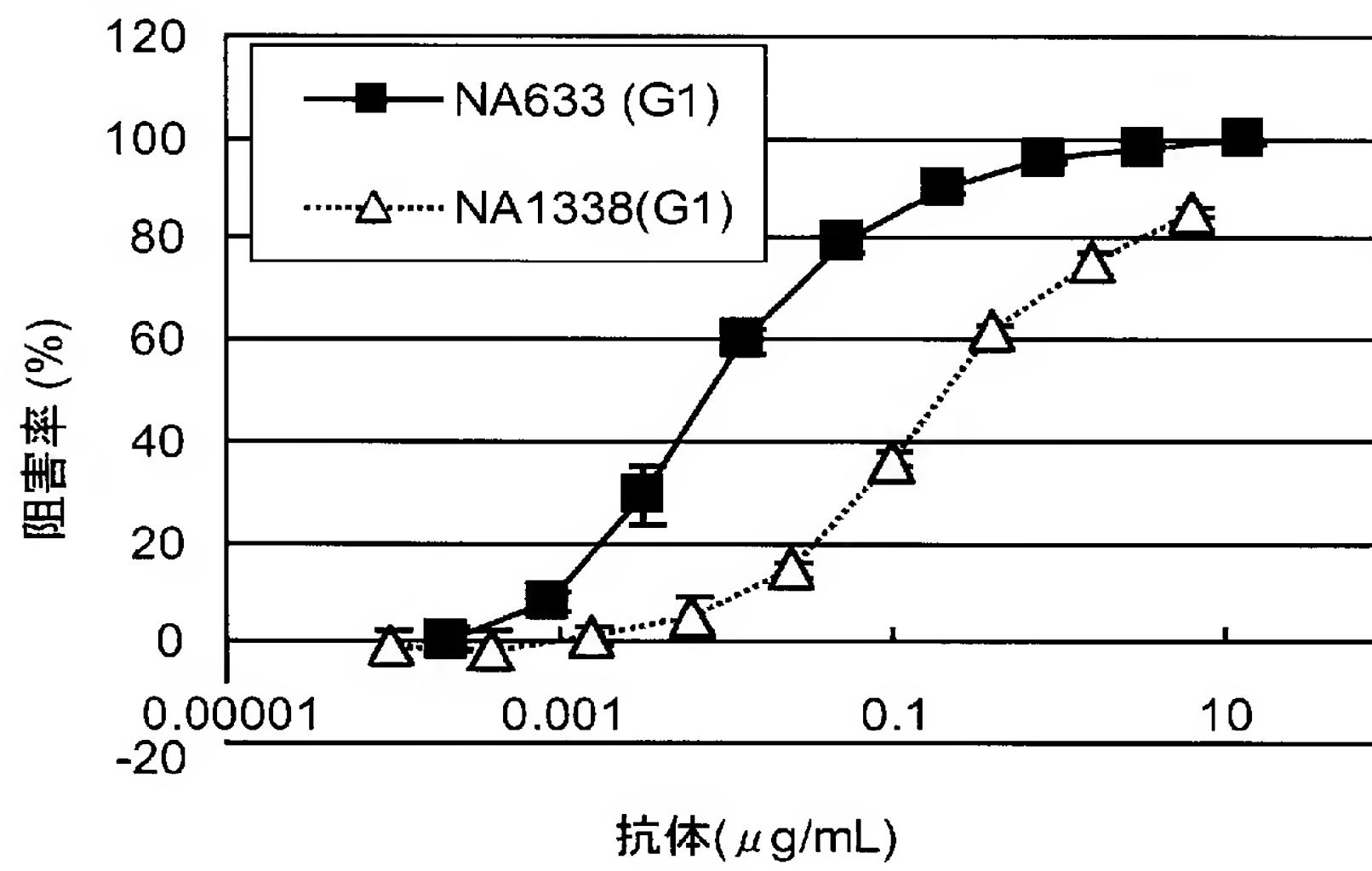
[図9]



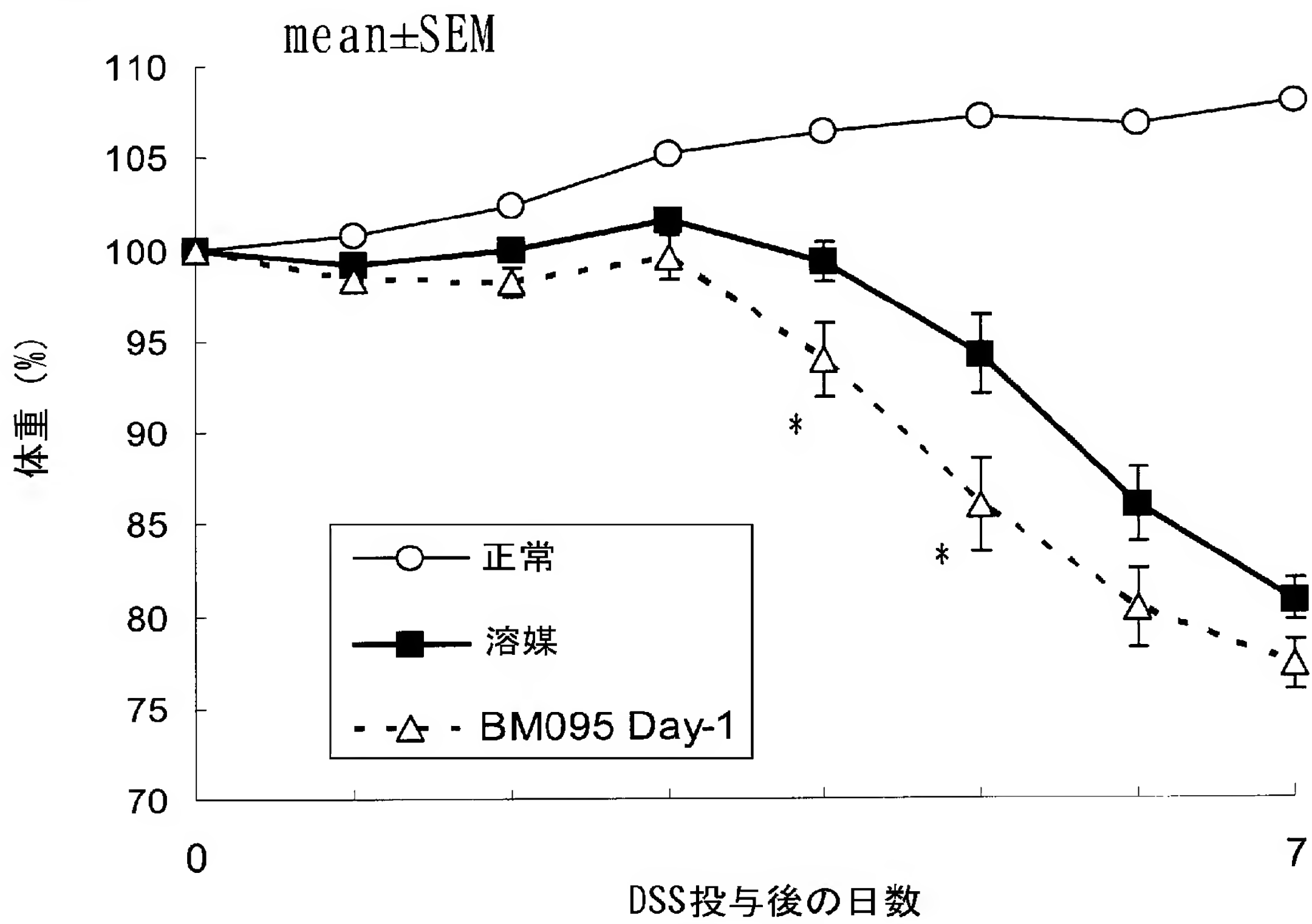
[図10]

カニクイザル ヒト	MMWTWALWMFPL LCKFGLAALPAKPENISCVYYRKNLTCTWSPGKETSYQTAKRTYAFGKKHDNCTTSSSTSENASCFFLPRITIPDNYTIEVEA MMWTWALWMLPSLCKFSLAALPAKPENISCVYYRKNLTCTWSPGKETSYQTVKRTYAFGEKHDNCTTNSSTSENASCFFLPRITIPDNYTIEVEA
カニクイザル ヒト	ENG DGV I KSDMT CWRLEDIAKTEPPEIFSVKPVLG I KRM I R I E W I KPELAPVSSDLKYALRFR TVNSTSWMEVNF AKNRKD TNQTYNLMGLQAFTEYVVA ENG DGV I KSHMT YWRL EN I AKTEPPK I FRVKPVLG I KRM I Q I E W I KPELAPVSSDLKYTLRFR TVNSTSWMEVNF AKNRKDKNQTYNLTGLQPFT EYV I A
カニクイザル ヒト	LRCAVKESKFWSDWSQEKMGMT EEEAPCGLELWRVLKPT EVDGRRPVRL WKKARGAPVLEKTLGYN I WYFPENNTNL TETVNTTNQQL ELHLGGESYVW LRCAVKESKFWSDWSQEKMGMT EEEAPCGLELWRVLKPAEADGRRPVRL WKKARGAPVLEKTLGYN I WYYPESNTNL TETMNTTNQQL ELHLGGESFWV
カニクイザル ヒト	SM I SYN S L G K S P V T T L R I P A I Q E K S F R C I E V M Q A C L A E D Q L V W K Q S S A L D V N T W M I E W F P D M D S E H P T L S W E S V S Q A T N W T I Q Q D K L K P F W C Y N I S V Y P SM I SYN S L G K S P V A T L R I P A I Q E K S F Q C I E V M Q A C V A E D Q L V W K Q S S A L D V N T W M I E W F P D V D S E P T T L S W E S V S Q A T N W T I Q Q D K L K P F W C Y N I S V Y P
カニクイザル ヒト	MLHDKVGE PYSI QAYAKEGI PSKGPETKVENIGVKTVT I TWKE I PKSERKG I ICN Y T I FYQAE G G K G F S K T V N S S I L Q Y G L E S L K R K T S Y T V R V M A S T S A MLHDKVGE PYSI QAYAKEGV PSEGPETKVENIGVKTVT I TWKE I PKSERKG I ICN Y T I FYQAE G G K G F S K T V N S S I L Q Y G L E S L K R K T S Y I V Q V M A S T S A
カニクイザル ヒト	GG I N G T S I N F K T L S F S V F E I I I T S L I G G G L L I I I L T V A Y G L K P N K L T H L C W P S V P N P A E S S I A T W R G D D F K D K L N L K E S D D S V N T E D R I L K P C S T P S GG I N G T S I N F K T L S F S V F E I I I T S L I G G G L L I I I L T V A Y G L K P N K L T H L C W P T V P N P A E S S I A T W H G D D F K D K L N L K E S D D S V N T E D R I L K P C S T P S
カニクイザル ヒト	DKLVIDKSVVNF GNVLQEMFIDEARTGQENNLGGEKNEYVTHPFRADCP LGKSFEELPVSP EIPPRKSQYL RSRMPEGTCL EAE EQLLVSGQSLES LAPD DKLVIDKL VVNF GNVLQEI FTDEARTGQENNLGGEKNGYVTCFPRPCPLGKSFEELPVSP EIPPRKSQYL RSRMPEGTRPEAKEQLLFSGQSL ---VPD
カニクイザル ヒト	HVREAAAPNPYL KNSVTTREFLV SQKLPEHTKGEV 735 (配列番号 : 24) HLC EEGAPNPYL KNSVTAREFLVSEKLPEHTKGEV 732 (配列番号 : 7)

[図11]

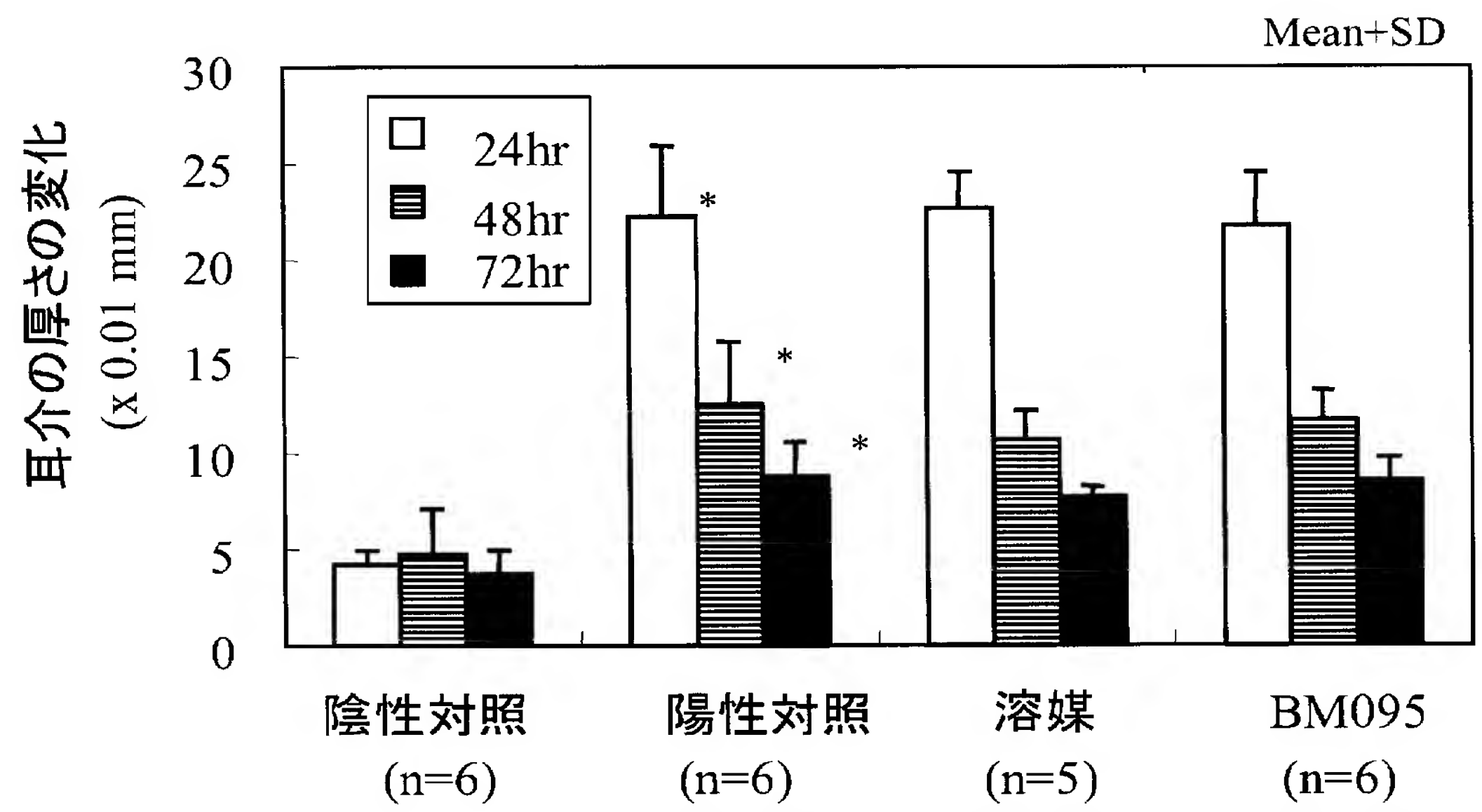


[図12]



* $P < 0.05$, 溶媒群に対するStudent t-検定

[図13]



* $P < 0.05$, 陰性対照群に対するStudent t-検定

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061625

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K45/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P11/06(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P21/04(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P37/00(2006.01)i, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K45/00, A61K39/395, A61P1/04, A61P1/16, A61P11/06, A61P17/02, A61P19/02, A61P21/04, A61P29/00, A61P37/00, A61P37/08, C07K16/28, C12N15/02 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI, BIOSIS (STN), CA (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2), Ichushi WEB		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2002/077230 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 03 October, 2002 (03.10.02), Pages 29 to 33, 67 to 68 & AU 2002239034 A1	1-17, 19 8
Y A	SONKOLY, E., <i>et al.</i> , IL-31: A new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006, Vol.117, No.2, p.411-417, abstract	8 1-7, 9-17, 19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 September, 2007 (03.09.07)		Date of mailing of the international search report 18 September, 2007 (18.09.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061625

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	BILSBOROUGH, J., <i>et al.</i> , IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006, Vol.117, No.2, p.418-425, abstract	8 1-7, 9-17, 19
Y A	Kin'ya NAGATA et al., "Atarashii Cytokine IL-31", Rheumatology, Kagaku Hyoronsha, 28 March, 2006 (28.03.06) Hakko, Vol.35, No.3, pages 282 to 286, ISSN:0915-227X, particularly, pages 284 to 285	8 1-7, 9-17, 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061625

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

A61P37/08(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/061625

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
It pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant’s protest and, where applicable, payment of a protest fee..

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant’s protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061625

<Subject of prior art document search>

In claims 1, 8 to 11 and 19, it is described that the active ingredient is specified by the expression "an NR10 antagonist".

In paragraphs [0010] to [0043] in the description, there are enumerated individual components of a preventive or a remedy for inflammatory diseases according to the inventions as set forth in the above claims. However, it is not mentioned in the description to what extent of specific substances are involved in the scope of the active ingredient specified by the expression as described above. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of such ingredient cannot be specified. Therefore, the above claims are described in such a manner as not complying with the requirement of clearness under PCT Article 6.

In the description, furthermore, the test results of confirming the effect of a preventive or a remedy for inflammatory diseases obtained by using BM095, which is a specific anti-NR10 antibody employed in EXAMPLE 1, were exclusively presented.

Furthermore, the description of the present application discloses neither test results nor common technical knowledge indicating that any inflammatory disease can be prevented or treated by using an NR10 antagonist. It is described in the paragraphs [0074] to [0075] in the description of the present application that BM095 would not exert a therapeutic effect on some inflammatory diseases. From this viewpoint, it can be understood that any inflammatory disease cannot be always prevented or treated by using an NR10 antagonist.

Accordingly, the indication that any inflammatory disease can be prevented or treated by using an NR10 antagonist is groundless.

Thus, nothing but the effect of BM095, which is a specific anti-NR10 antibody employed as the active ingredient in EXAMPLE of the present application, as a preventive or a remedy for atopic dermatitis, chronic dermatitis, rheumatism and arthritis deformans is disclosed in the meaning within PCT Article 5 and supported in the meaning within PCT Article 6.

Concerning claims 1, 8 to 11 and 19, therefore, the search for prior art documents of the present international application was made exclusively in the cases where the active ingredient is anti-NR10 antibody and in the cases where the disease is atopic dermatitis, chronic dermatitis, rheumatism or arthritis deformans while taking the statement in the description into consideration.

国際調査報告		国際出願番号 P C T / J P 2 0 0 7 / 0 6 1 6 2 5	
A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. 特別ページ参照			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. A61K45/00, A61K39/395, A61P1/04, A61P1/16, A61P11/06, A61P17/02, A61P19/02, A61P21/04, A61P29/00, A61P37/00, A61P37/08, C07K16/28, C12N15/02			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 0 7 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 0 7 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 0 7 年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） WPI, BIOSIS(STN), CA(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN), REGISTRY(STN), JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2), 医中誌 WEB			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	WO 2002/077230 A1（中外製薬株式会社）2002.10.03, 第 29-33 及び 67-68 ページ参照 & AU 2002239034 A1 SONKOLY, E., <i>et al.</i> , IL-31: A new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006, Vol.117, No.2, p.411-417, 要約欄	1-17 及び 19	
Y		8	
Y		8	
A		1-7, 9-17 及び 19	
<input checked="" type="checkbox"/> C 欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 0 3 . 0 9 . 2 0 0 7		国際調査報告の発送日 1 8 . 0 9 . 2 0 0 7	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号		特許庁審査官（権限のある職員） 横井 宏理 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2	4 C 3 7 6 9

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2005年4月)

発明の属する分野の分類

A61K45/00 (2006.01) i, A61K39/395 (2006.01) i, A61P1/04 (2006.01) i, A61P1/16 (2006.01) i,
A61P11/06 (2006.01) i, A61P17/02 (2006.01) i, A61P19/02 (2006.01) i, A61P21/04 (2006.01) i,
A61P29/00 (2006.01) i, A61P37/00 (2006.01) i, A61P37/08 (2006.01) i, C07K16/28 (2006.01) i,
C12N15/02 (2006.01) i

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1． b の続き）

- 1．この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、
以下に基づき国際調査を行った。
- a．タイプ

☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル
- b．フォーマット

☐ 紙形式

☒ 電子形式
- c．提出時期

☒ 出願時の国際出願に含まれていたもの

☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの
- 2．☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
- 3．補足意見：

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2) (a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1 8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
治療による処置方法に関するものであって、P C T 規則 3 9 . 1 （ i v ） の規定により、
国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6 . 4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

＜先行技術文献調査の対象について＞

請求の範囲 1、8－11 及び 19 には、有効成分を「NR10 アンタゴニスト」という表現にて特定する記載がある。

上記請求の範囲に係る発明の炎症性疾患の予防または治療剤に関し、明細書の段落 [0010]－[0043] に各成分が列挙されているが、明細書には上記表現による有効成分が具体的にどのようなものまでを包含するかを説明する記載はなく、出願時の技術常識を勘案しても、そのようなものの範囲を特定することができないから、上記請求の範囲の記載は、PCT 第 6 条に規定する明確性を欠いている。

また、明細書に炎症性疾患の予防または治療の効果を確認した試験結果が示されているのは、実施例 1 で用いた特定の抗 NR10 抗体である BM095 による場合だけである。

加えて、本願明細書には、NR10 アンタゴニストであれば、どのような炎症性疾患であっても、予防または治療できるということを説明する試験結果や技術常識の記載はない。炎症性疾患の種類によっては、BM095 は治療の効果の有しないという本願明細書段落 [0074]－[0075] の記載からみても、NR10 アンタゴニストであれば、どのような炎症性疾患であっても、予防または治療できるというものではないと理解できる。

してみると、NR10 アンタゴニストであれば必ず炎症性疾患を治療できるものであるという点については裏付けを欠いている。

したがって、PCT 第 5 条の意味において開示され、PCT 第 6 条の意味において裏づけられているのは、本願実施例で用いた特定の抗 NR10 抗体である BM095 を有効成分とするアトピー性皮膚炎、慢性皮膚炎、リウマチ及び変形性関節症の予防または治療剤としての効果のみである。

よって、本国際出願の先行技術文献調査は、請求の範囲 1、8－11 及び 19 については、明細書の記載も考慮して、有効成分については抗 NR10 抗体である場合、疾患についてはアトピー性皮膚炎、慢性皮膚炎、リウマチ及び変形性関節症である場合に限定しておこなった。